HU 0002237640 B1

(19) HU

MAGYAR KÖZTÁRSASÁG
Magyar Szabadalmi Hivatal

(11) Lajstromszám: 223 764 (13) B1

SZABADALMI LEÍRÁS

(21) A bejelentés ügyszáma: P 97 00851
(22) A bejelentés napja: 1997. 05. 06.

(51) Int. Cl.[7]: C 12 P 13/08
C 12 N 15/52

(40) A közzététel napja: 1999. 06. 28.
(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi Közlöny és Védjegyértesítőben: 2005. 01. 28.

(30) Elsőbbségi adatok:
8-142812 1996. 06. 05. JP

(72) Feltalálók:
Sugimoto, Masakazu, Kawasaki-shi, Kanagawa (JP);
Hirano, Seiko, Kawasaki-shi, Kanagawa (JP);
Nakano, Eiichi, Kawasaki-shi, Kanagawa (JP);
Izui, Masako, Kawasaki-shi, Kanagawa (JP);
Hayakawa, Atsushi, Kawasaki-shi, Kanagawa (JP);
Yoshihara, Yasuhiko, Kawasaki-shi, Kanagawa (JP);
Nakamatsu, Tsuyoshi, Kawasaki-shi, Kanagawa (JP)

(73) Jogosult:
Ajinomoto Co., Inc., Tokió (JP)

(74) Képviselő:
Schläfer László, DANUBIA Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft., Budapest

(54) **Eljárás L-lizin előállítására**

(57) Kivonat

A találmány tárgya korineform baktériumok sejtjeiben automatikusan kifejeződő rekombináns DNS, amely diamino-pimelát-dekarboxilázt kódoló DNS-szekvenciát és diamino-pimelát-dehidrogenázt kódoló DNS-szekvenciát tartalmaz.

A találmány kiterjed az ilyen DNS-t tartalmazó baktériumokra, valamint L-lizin előállítására ilyen baktériumok tenyésztésével.

HU 223 764 B1

A találmány tárgya eljárás L-lizin előállítására aminosavak és hasonló anyagok fermentatív előállítására alkalmazott korineform baktériumok biotechnológiai módosításával kapott mikroorganizmusok tenyésztésével.

A takarmányadalékként alkalmazott L-lizint általában fermentatív módszerekkel állítják elő korineform baktériumok közé tartozó, L-lizint termelő mutáns törzsek segítségével. A jelenleg ismert, különböző L-lizint termelő baktériumokat a korineform baktériumok közé tartozó vad típusú törzsek mesterséges mutálásával állították elő.

A korineform baktériumoknál ismert egy olyan vektorplazmid, amely a baktériumsejtekben autonóm módon elszaporodik, és gyógyszerhatóanyaggal szemben rezisztens markergént tartalmaz (US 4.514.502 számú irat). Ismert továbbá a génnek baktériumsejtekbe történő bevezetésére szolgáló módszer (JP 2–207.791 számú irat). Leírták azt is, hogy az ismertetett módszerekkel L-treonint vagy L-izoleucint termelő baktériumok is tenyészthetők (US 4.452.890 és US 4.442.208 számú irat). Az L-lizint termelő baktériumok tenyésztéséhez ismert egy olyan eljárás, amelynek során az L-lizin bioszintézisében részt vevő gént építenek be egy vektorplazmidba, és a gént így viszik be baktériumsejtekbe (például JP 56-160.997 számú irat).

Az L-lizin bioszintéziséből ismert gének például a dihidro-dipikolinát-reduktáz-gén JP 7-75.578 számú irat) és a diamino-pimelát-dehidrogenáz-gén [Ishino S. és munkatársai: Nucleic Acids Res., 15, 3917 (1987)], amelyek klónozott gének. Az L-lizin bioszintézisében részt vesznek továbbá a foszfoeno-piruvát-karboxilázgén (JP 60-87.788 számú irat), a dihidro-dipikolinátszintáz-gén (JP 6-55.149 számú irat), és a diamino-pimelát-dekarboxiláz-gén (JP 60-62.994 számú irat), amelyek alkalmazása befolyásolja az L-lizin termelését.

Mint fent említettük, az L-lizin-termelését sikeresen fokozták az L-lizin bioszintézisében részt vevő gének alkalmazásával. Egyes gének azonban csökkentik a baktérium növekedési sebességét annak ellenére, hogy javítják az L-lizin-termelést. Ennek következtében végeredményben csökken az L-lizin termelése.

Nem ismert olyan megoldás, amelyben a növekedést az L-lizin bioszintézisét fokozó génnel javítják. A korineform baktériumoknál nem ismert olyan megoldás, amelynél az L-lizin bioszintézisében részt vevő gének kombinálásával jelentős módon növelhető az L-lizin termelése a növekedés csökkentése nélkül.

A találmány feladata egy korineform baktérium L-lizin-termelő képességének fokozása a növekedési sebesség csökkentése nélkül oly módon, hogy a korineform baktériumban feldúsítjuk az L-lizin bioszintézisében részt vevő géneket.

Egy adott anyagnak egy mikroorganizmus fermentálásával történő előállításánál különösen fontos faktor a termelés sebessége, valamint az adott anyagnak a bevitt anyagra vonatkoztatott kitermelése. Egy adott anyag sokkal olcsóbban előállítható, ha növeljük a fermentálóberendezés egységére vonatkoztatott termelési sebességet. Ipari szempontból ezért különösen fontos, hogy összhangban legyen a fermentatív kitermelés és a termelési sebesség. A találmány megoldást kínál a fenti problémára, és lehetővé teszi L-lizin fermentatív előállítását korineform baktérium segítségével.

A találmány szerinti megoldás lényege az a felismerés, hogy a korineform baktérium növekedése gyorsítható, és az L-lizin termelésének sebessége fokozható, ha feldúsítjuk a diamino-pimelát-dekarboxilázt kódoló DNS-szekvenciát (a diamino-pimelát-dekarboxilázt a továbbiakban DDC rövidítéssel, és a DDC-fehérjét kódoló gént továbbiakban lysA rövidítéssel jelöljük), és a diamino-pimelát-dehidrogenázt kódoló DNS-szekvenciát (a továbbiakban a diamino-pimelát-dehidrogenázt DDH rövidítéssel és a DDH-fehérjét kódoló gént ddh rövidítéssel jelöljük). Ha mindkét fenti DNS-szekvenciát dúsítjuk, akkor jobb eredményeket érünk el, mint ha a két DNS-szekvencia közül csak az egyiket dúsítanánk fel.

A találmány tárgya tehát korineform baktériumok sejtjeiben autonóm módon kifejeződő rekombináns DNS, amely diamino-pimelát-dehidrogenázt kódoló DNS-szekvenciát és diamino-pimelát-dekarboxilázt kódoló DNS-szekvenciát tartalmaz.

A találmány tárgya továbbá olyan korineform baktérium, amely dúsítva tartalmazza a diamino-pimelát-dehidrogenázt kódoló DNS-szekvenciát, és a diamino-pimelát-dekarboxilázt kódoló DNS-szekvenciát.

A találmány tárgya továbbá eljárás L-lizin előállítására oly módon, hogy valamely fenti korineform baktériumot L-lizin termelését és felhalmozását biztosító közegben tenyésztünk, és az L-lizint a tenyészetből begyűjtjük.

A találmány értelmében korineform baktériumnak a Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8. kiadás, 599. oldal (1974) szerint olyan mikroorganizmust nevezünk, amely spóraképző képességgel rendelkező, nem savhoz kötött, pálcika alakú, aerob, Gram-pozitív baktérium. A korineform baktériumok közé tartoznak például a Corynebacterium nembe tartozó baktériumok, a Brevibacterium nembe tartozó baktériumok, amelyeket korábban a Brevibacterium nembe soroltak, de egyesítették a Corynebacterium nembe tartozó baktériumokkal, valamint a Brevibacterium rendbe tartozó baktériumok, amelyek közeli rokonságban vannak a Corynebacterium rendbe tartozó baktériumokkal.

A találmány szerinti megoldás lehetővé teszi a korineform baktériumok L-lizint termelő képességének növelését, valamint a növekedési sebesség növelését. A találmány szerinti megoldás alkalmazható a szokásos L-lizin-termelő baktériumoknál, valamint a nagy L-lizin-termelő képességgel rendelkező törzseknél.

Az 1. ábra lysA-tartalmú p299LYSA plazmid előállítását és szerkezetét mutatja.

A 2. ábra lysA- és Brevi.-ori-tartalmú pLYSAB plazmid előállítását és szerkezetét mutatja.

A 3. ábra ddh- és Brevi.-ori-tartalmú pPK4D plazmid előállítását és szerkezetét mutatja.

A 4. ábra ddh- és lysA-tartalmú p399DL plazmid előállítását és szerkezetét mutatja.

Az 5. ábra ddh-, lysA- és Brevi.-ori-tartalmú pDL plazmid előállítását és szerkezetét mutatja.

A 6. ábra egyenként lysC-tartalmú p399AKYB és p399AK9B plazmid előállítását és szerkezetét mutatja.

A 7. ábra dapB- és Brevi.-ori-tartalmú pDPRB plazmid előállítását és szerkezetét mutatja.

A 8. ábra dapA- és Brevi.-ori-tartalmú pDPSB plazmid előállítását és szerkezetét mutatja.

A 9. ábra lysC-, dapB- és Brevi.-ori-tartalmú pCRCAB plazmid előállítását és szerkezetét mutatja.

A 10. ábra mutáns lysC-, dapB- és Brevi.-ori-tartalmú pCB plazmid előállítását és szerkezetét mutatja.

A 11. ábra dapA-, dapB- és Brevi.-ori-tartalmú pAB plazmid előállítását és szerkezetét mutatja.

A 12. ábra mutáns lysC-, dapA-, dapB- és Brevi.-ori-tartalmú pCAB plazmid előállítását és szerkezetét mutatja.

A 13. ábra mutáns lysC-, dapA-, dapB-, lysA- és Brevi.-ori-tartalmú pCABL plazmid előállítását és szerkezetét mutatja.

A 14. ábra mutáns lysC-, dapA-, dapB-, ddh-, lysA- és Brevi.-ori-tartalmú pCABDL plazmid előállítását és szerkezetét mutatja.

A találmány szerinti megoldást a következőkben részletesen ismertetjük:

1. *A találmány szerinti megoldásban felhasználásra kerülő, L-lizin bioszintézisében részt vevő gének előállítása*

A találmány szerinti megoldásban felhasználásra kerülő, L-lizin bioszintézisében részt vevő gének előállíthatók, ha egy DNS-donorként felhasznált baktériumból kromoszomális DNS-t állítunk elő, plazmid vektor vagy hasonló anyag felhasználásával kromoszomális DNS-tárat képezünk, és a kiválasztott törzsből feltárjuk azt a rekombináns DNS-t, amelybe inszertálódott a gén. A találmány szerinti megoldásban felhasználásra kerülő, az L-lizin bioszintézisében részt vevő génekre vonatkozó DNS-donor nincs közelebbről korlátozva, amennyiben az L-lizin bioszintézisében részt vevő kívánt gén korineform baktériumsejtekben működőképes enzimfehérjét fejez ki. DNS-donorként azonban előnyösen korineform baktériumot használunk.

A korineform baktériumból származó lysA és ddh gének szekvenciája ismert. Ennek megfelelően, ezek előállíthatók a polimerázláncreakció-módszerrel [PCR, Whilte T. J. és munkatársai: Trends Genet., 5, 185, (1989)].

A találmány szerinti megoldásban felhasználásra kerülő valamennyi, az L-lizin bioszintézisében részt vevő gén előállítható a példaszerűen bemutatott módszerek valamelyikével.

(1) Mutáns lysA előállítása

A lysA korineform baktérium kromoszómájából izolálható, amelyhez kromoszomális DNS-t állítunk elő például Saito és Miura módszerével [H. Saito és K. Miure: Biochem. Biophys. Acta, 72, 619 (1963)]. A lysA-t a polimerázláncreakció-módszerrel használjuk [PCR; White T. J. és munkatársai: Trends Genet., 5, 185 (1989)]. Ehhez tetszőleges DNS-donor felhasználható, de előnyösen alkalmazható a Brevibacterium lactofermentum ATCC 13 869 számú törzse.

A korineform baktériumokban a lysA egy operont képez az argS génnel (arginil-tRNS szintáz gén) együtt, és a lysA az argS alatt helyezkedik el. A lysA kifejezését az argS felett található promoter szabályozza [Journal of Bacteriology, Nov., 7356–7362 (1993)]. A fenti gének DNS-szekvenciája ismert a Corynebacterium glutamicumból [Molecular Microbiology, 4(11), 1819–1830 (1990); Molecular and General Genetics, 212, 112–119 (1988)], amelynek alapján PCR-hez használható DNS-primerek állíthatók elő. Az ilyen DNS-primerekre példaként említhetők a 23 bázispárból álló DNS-szekvenciák, így a szekvencialistában megadott 1 számú nukleotidszekvencia [amely a Molecular Microbiology, 4(11), 1819–1830 (1990) helyen ismertetett nukleotidszekvencia 11–33. nukleotidjának felel meg] és a 2-es számú nukleotidszekvencia [amely a Molecular and General Genetics, 212, 112–119 (1988) helyen ismertetett nukleotidszekvencia 1370–1392. nukleotidjának felel meg].

A példákban a lysA feldúsítására egy promotert, argS-t és lysA-t tartalmazó DNS-fragmenst használunk. A találmány szempontjából azonban az argS nem lényeges elem. Alkalmazható olyan DNS-fragmens is, amelyben közvetlenül a promoter alá lysA van ligálva.

Egy argS-t és lysA-t tartalmazó DNS-fragmens nukleotidszekvenciáját és ebből levezethető aminosavszekvenciát mutat a 3-as számú szekvencia. Az argS által kódolt aminosavszekvencia egyik példáját mutatja a 4-es számú szekvencia, és a lysA által kódolt aminosavszekvencia egyik példáját mutatja az 5-ös számú szekvencia. A fenti aminosavszekvenciákat kódoló DNS-fragmens mellett a találmány értelmében alkalmazhatók olyan ekvivalens DNS-fragmensek, amelyek az 5-ös számú szekvenciával lényegében azonos aminosavszekvenciát kódolnak, nevezetesen, például egy vagy több aminosav helyettesítésén, kiiktatásán vagy beépítésén alapuló mutációt tartalmazó aminosavszekvenciák, amennyiben a DDC-aktivitás lényegesen nem változik meg.

A DNS szintetizálása megvalósítható az Applied Biosystems 380B modelszámú DNS-szintetizáló berendezésén a foszfoamiditmódszerrel [Tetrahedron Letters, 22, 1859 (1981)]. A PCR megvalósítható például a Takara Shuzo által forgalmazott DNA Thermal Cycler Model PJ2000 típusú berendezéssel és Taq DNS-polimerázzal a gyártó előírásai szerint.

A PCR-módszerrel kapott lysA-t előnyösen E. coli és/vagy korineform baktériumsejtekben autonóm módon szaporodó vektor-DNS-sel ligáljuk, majd a kapott rekombináns DNS-t E. coli-sejtekbe visszük. Ez a lépés megkönnyíti a következő műveleteket. Az E. coli-sejtekben autonóm módon lemásolható vektorként előnyösen olyan plazmid vektort használunk, amely előnyösen autonóm módon lemásolható a gazdasejtben, példaként említhető a pUC19, pUC18, pBR322, pHSG299, pHSG399, pHSG398 és RSF1010.

Ha ezekbe a vektorokba olyan DNS-fragmenst inszertálunk, amely lehetővé teszi, hogy a plazmid autonóm módon elszaporodjon a korineform baktériumban, akkor ezek úgynevezett „shuttle" vektorként alkalmazhatók, amelyek autonóm módon elszaporodnak, mind az E. coli, mind a corineform baktériumsejtekben.

Ilyen „shuttle" vektorként alkalmazhatók a következők (felsorolásban megadjuk a vektort hordozó mikroorganizmust és a nemzetközi letétbe helyezés számát):

pHC4: Escherichia coli AJ12617 (FERM BP–3532)
pAJ655: Escherichia coli AJ11882 (FERM BP–136)
Corynebacterium glutamicum SR8201 (ATCC 39 135)
pAJ1844: Escherichia coli AJ11883 (FERM BP–137)
Corynebacterium glutamicum SR 8202 (ATCC 39 136)
pAJ611: Escherichia coli AJ11884 (FERM BP–138)
pAJ3148: Corynebacterium glutamicum SR8203 (ATCC 39 137)
pAJ440: Bacillus subtilis AJ11901 (FERM BP–140).

Ezek a vektorok a letétbe helyezett mikroorganizmusból előállíthatók. Ehhez a sejteket a logaritmikus növekedési fázisban összegyűjtjük, lizozim és SDS alkalmazásával roncsoljuk, majd a lizátumot 30 000 g értéken centrifugáljuk. A felülúszóhoz polietilénglikolt adunk, majd frakcionáljuk, és cézium-klorid/etidium-bromid kiegyensúlyozott sűrűséggradiens centrifugálással tisztítjuk.

Az E. coli transzformálásához a plazmidot például D. M. Morrison módszerével [Methods in Enzymology, 68, 326 (1979)] visszük be, vagy a befogadó sejteket kalcium-kloriddal kezeljük a DNS behatolóképességének fokozásához [Mandel M. és Higa A.: J. Mol. Biol., 53, 159 (1970)].

(2) ddh előállítása

A ddh-t tartalmazó DNS-fragmens előállítható korineform baktériumok kromoszómájából a PCR-módszerrel. DNS-donorként tetszőleges baktérium alkalmazható, előnyös a Brevibacterium lactofermentum ATCC 13 869 törzs.

A DDH gén ismert a Corynebacterium glutamicumból [Ishino S. és munkatársai: Nucleic Acids Res., 15, 3917 (1987)], amelynek alapján PCR-hez szükséges primerek állíthatók elő. Az ilyen DNS-primerekre példaként említhetők a 20 bázispárból álló DNS-szekvenciák, így a szekvencialistában megadott 6-os és 7-számú nukleotidszekvencia. A DNS szintézisét, a PCR-módszert és a kapott ddh-t hordozó plazmid előállítását a lysA esetében ismertetett módon végezzük.

A ddh-t tartalmazó DNS-fragmens nukleotidszekvenciáját és az ebből levezetett aminosavszekvenciát a 8-as számú szekvencia ismerteti. Csak az aminosavszekvenciát mutatja a 9-es számú szekvencia. A fenti aminosavszekvenciát kódoló DNS-fragmensek mellett a találmány értelmében alkalmazhatók olyan DNS-fragmensek is, amelyek a 9-es számú szekvenciával lényegében azonos aminosavszekvenciákat kódolnak, nevezetesen például egy vagy több aminosav helyettesítésével, kiiktatásával vagy beépítésével mutált aminosavszekvenciákat, amennyiben a DDH-aktivitás lényegesen nem változik meg.

2. Találmány szerinti rekombináns DNS és korineform baktérium

A találmány szerinti korineform baktérium dúsított formában diamino-pimelát-dekarboxilázt (lysA) kódoló DNS-szekvenciát, és diamino-pimelát-dehidrogenázt (ddh) kódoló DNS-szekvenciát tartalmaz. A dúsított DNS-szekvencia itt azt jelenti, hogy a DNS-szekvencia által kódolt enzim intracelluláris aktivitását fokozzuk, például úgy, hogy növeljük a gén másolatainak számát, erős promotert használunk, nagy specifikus aktivitással rendelkező enzimet kódoló gént használunk vagy ezeket kombináljuk.

A fent ismertetett DNS-szekvenciát tartalmazó korineform baktérium egy L-lizint termelő korineform baktérium, ami lehet az L-lizint termelő vad típusú törzs vagy mesterségesen mutált törzs, vagy biotechnikai módszerekkel fokozott L-lizin-termelékenységgel rendelkező korineform baktérium. Ha a baktérium L-lizin-termelékenysége alacsony, akkor ez növelhető a lysA és ddh dúsításával. Ha a baktérium L-lizin-termelékenysége magas, akkor az L-lizin-termelés tovább fokozható a lysA és ddh dúsításával.

(1) A korineform baktériumok közé tartozó, L-lizint termelő törzsek

A lysA és ddh beviteléhez használt korineform baktériumokra példaként említhetők a következő, lizint termelő törzsek:

Corynebacterium acetoacidophilum ATCC 13 870
Corynebacterium acetoglutamicum ATCC 15 806
Corynebacterium callunae ATCC 15 991
Corynebacterium glutamicum ATCC 13 032
(Brevibacterium divaricatum) ATCC 14 020
(Brevibacterium lactofermentum) ATCC 13 869
(Corynebacterium lilium) ATCC 15 990
(Brevibacterium flavum) ATCC 14 067
Corynebacterium melassecola ATCC 17 965
Brevibacterium saccharolyticum ATCC 14 066
Brevibacterium immariophilum ATCC 14 068
Brevibacterium roseum ATCC 13 825
Brevibacterium thiogenitalis ATCC 19 240
Microbacterium ammoniaphilum ATCC 15 354
Corynebacterium thermoaminogenes AJ 12 340 (FERM BP–1539).

A fent említett baktériumtörzsek mellett a lysA és ddh dúsítására alkalmazhatók például olyan mutáns törzsek, amelyek L-lizin-termelő képessége a fent említett törzsekből származik. Az ilyen mesterséges mutáns törzsekre példaként említhetők a következők:

S-(2-amino-etil)-ciszteinre (továbbiakban AEC) rezisztens mutáns törzsek (Brevibacterium lactofermentum AJ11082 (NRRL B-11470), JP 56-1914, JP 56-1915, JP 57-14157, JP 57-14158, JP 57-30474, JP 58-10075, JP 59-4993, JP 61-35840, JP 62-24074, JP 62-36673, JP 5-11958, JP 7-112437 és JP 7-112438 számú irat);

növekedésükhöz aminosavat, így L-homoszerint igénylő mutáns törzsek (JP 48–28078 és JP 56-6499 számú irat);

AEC-re rezisztens és aminosavat, így L-leucint, L-homoszerint, L-prolint, L-szerint, L-arginint, L-alanint és

L-valint igénylő mutáns törzsek (US 3.708.395 és US 3.825.472 számú irat);
DL-α-amino-ε-karbolaktámra, α-amino-lauril-laktámra, aszpartátanalógokra, szulfadrogokra, quinoidra és N-lauroil-leucinra rezisztens, L-lizint termelő mutáns törzsek;
oxi-alo-acetát-dekarboxiláz vagy légzőrendszerenzimek inhibitoraira rezisztens. L-lizint termelő mutáns törzsek (JP 50-53588, JP 50-31093, JP 52-102498, JP 53-9394, JP 53-86089, JP 55-9783, JP 55-9759, JP 56-32995, JP 56-39778, JP 53-43591 és JP 53-1833 számú irat);
inozitolt vagy ecetsavat igénylő, L-lizint termelő mutáns törzsek (JP 55-9784 és JP 56-8692 számú irat);
fluor-piruvinsavra vagy 34 °C feletti hőmérsékletre érzékeny, L-lizint termelő mutáns törzsek (JP 55-9783 és JP 53–86090 számú irat); és
Brevibacterium vagy Corynebacterium nembe tartozó, etilénglikolra rezisztens és L-lizint termelő mutáns törzsek (US 4.411.997 számú irat).

(2) Genetikai rekombinációval megnövelt L-lizin-termelékenységgel rendelkező L-lizint termelő korineform baktériumok

Az L-lizin termelésének sebessége tovább növelhető a lysA és ddh dúsításával, ha a korineform baktériumban az L-lizin termelését biotechnológiai módszerrel dúsítjuk. Ez lehet például a visszacsatolásos gátlást hatástalanító mutációt hordozó enzimet kódoló gén bevitele, ahol az enzim vad típusa részt vesz az L-lizin bioszintézisében részt vevő enzimek visszacsatolásos gátlásában, vagy az L-lizin bioszintézisében részt vevő és lysA-tól és ddh-tól eltérő gének dúsítása.

A fokozott L-lizin-termelékenységgel rendelkező korineform baktériumra példaként említhető az olyan aszpartokinázt kódoló DNS-szekvenciát hordozó korineform baktérium, amelyre hatástalan az L-lizin és L-treonin visszacsatolásos gátlása (az aszpartokinázt a továbbiakban AK rövidítéssel, az AK-fehérjét kódoló gént a továbbiakban lysC rövidítéssel jelöljük), dihidro-dipikolinát-reduktázt kódoló DNS-szekvenciát hordozó korineform baktérium (a dihidro-dipikolinát-reduktázt a továbbiakban a DDPR rövidítéssel és a DDPR-fehérjét kódoló gént a továbbiakban dapB rövidítéssel jelöljük), valamint a dihidro-dikikolinát-szintázt kódoló DNS-szekvenciában feldúsított korineform baktérium (a dihidro-dipikolinát-szintázt a továbbiakban DDPS rövidítéssel, és a DDPS-fehérjét kódoló gént a továbbiakban dapA rövidítéssel jelöljük). A találmány szerinti megoldásban felhasználásra kerülő valamennyi, az L-lizin bioszintézisében részt vevő gén előállítható az ismertetett módszerekkel.

(i) Mutáns lysC előállítása

A mutáns lysC-t tartalmazó DNS-fragmens előállítható olyan mutáns törzsből, amelyben az AK-aktivitás L-lizin és L-treonin által végzett szinergetikus visszacsatolásos gátlása lényegében hatástalanítva van (WO 94/25605 számú irat). Az ilyen mutáns törzs előállítható például egy korineform baktérium vad típusú törzsének sejtjeiből a szokásos mutációs eljárásokkal, így ultraibolya-besugárzással vagy mutagén szerrel, így N-metil-N'-nitro-N-nitrozó-guanidinnel végzett kezeléssel. Az AK-aktivitás mérhető Miyajima R. és munkatársai: The Journal of Biochemistry, 63(2), 139–148 (1968) szerint. Mutáns törzsként előnyösen alkalmazható az L-lizint termelő AJ3445 baktérium (FERM P–1944), amely a Brevibacterium lactofermentum ATCC 13 869 (jelenlegi nevén Corynebacterium glutamicum) vad típusú törzsének mutációs kezeléséből származik.

Alternatív módon, a mutáns lysC előállítható a vad típusú lysC-t tartalmazó plazmid DNS in vitro mutációs kezelésével. Az AK L-lizin és L-treonin által végzett szinergetikus visszacsatolásos gátlásának hatástalanításához szükséges mutáció megvalósítása ismert (WO 94/25605 számú irat). Ennek megfelelően, a mutáns lysC előállítható a vad típusú lysC-ből például helyspecifikus mutációval.

A lysC-t tartalmazó DNS-fragmens előállítható egy korineform baktérium kromoszómájából PCR-módszerrel. A DNS-primerekre példaként említhető a 23 és 21 bázispárból álló egyszálú DNS-szekvenciák, így a szekvencialistában megadott 10- és 11-es számú szekvencia. Ezek lehetővé teszik például a Corynebacterium glutamicum ismert szekvenciájából származó és mintegy 1643 bp méretű, lysC-t kódoló szakasz [Molecular Microbiology, 5(5), 1197–1204 (1991); Mol. Gen. Genet., 224, 317–324 (1990)] alkalmazását. A DNS szintézisét, a PCR-módszert és a lysC-t tartalmazó plazmid előállítását a lysA ismertetésénél megadott módszerekkel végezzük.

Vad típusú lysC állítható elő, ha AK vad típusú törzsből lysC-t izolálunk, míg mutáns lysC-t kapunk, ha mutáns AK törzsből lysC-t izolálunk a fent ismertetett módszerekkel.

Vad típusú lysC-t tartalmazó DNS-fragmens nukleotidszekvenciáját ismerteti például a szekvencialistában megadott 12-es számú szekvencia. A nukleotidszekvenciából származó vad típusú AK-fehérje α-alegységének aminosavszekvenciáját mutatja a hozzá tartozó DNS-szekvenciával együtt a 13-as számú szekvencia. Csak az aminosavszekvenciát mutatja a 14-es számú szekvencia. A DNS nukleotidszekvenciájából származó vad típusú AK-fehérje β-alegységének aminosavszekvenciáját és a hozzá tartozó DNS-szekvenciát mutatja a 15-ös számú szekvencia. Csak az aminosavszekvenciát mutatja a 16-os számú szekvencia. Az egyes alegységekben iniciátorkodonként GTG szolgál, és a megfelelő aminosav a metionin. Az ismertetés azonban metioninra, valinra vagy formil-metioninra vonatkozik.

A találmány értelmében tetszőleges mutáns lysC alkalmazható, amennyiben olyan AK-t kódol, amelyben az L-lizin és L-treonin által végzett szinergetikus visszacsatolásos gátlás hatástalanítva van. A mutáns lysC-re példaként említhető az olyan mutáció, amelyben az N-terminális végtől számított 279. alaninmaradék helyett alanintól eltérő és az α-alegységben található savas aminosavtól eltérő aminosavmaradék található, és a 30. alaninmaradék helyett alanintól eltérő és a vad típusú AK β-alegységében található savas aminosavmaradéktól eltérő aminosavmaradék található.

A vad típusú AK aminosavszekvenciáját a 14-es számú szekvencia mutatja az α-alegység vonatkozásában, és a 16-os számú szekvencia mutatja a β-alegység vonatkozásában.

Az alanintól és más savas aminosavtól eltérő aminosavmaradékra előnyös példaként említhető a treonin, arginin, cisztein, fenil-alanin, prolin, szerin, tirozin és valin.

A helyettesített aminosavmaradékra vonatkozó kodonként tetszőleges kodon használható, amennyiben a kívánt aminosavmaradékot kódolja. Feltételezhető, hogy a vad típusú AK aminosavszekvenciája enyhe eltéréseket mutat a baktérium fajtájától és törzsétől függően. A találmány értelmében alkalmazható továbbá olyan AK, amely az enzimaktivitás szempontjából irreveláns egy vagy több pozícióban található egy vagy több aminosavmaradék helyettesítésével, kiiktatásával vagy beépítésével mutációt hordoz. Felhasználható továbbá minden olyan AK, amely egy vagy több aminosav helyettesítésével, kiiktatásával vagy beépítésével olyan mutációt hordoz, amely nem befolyásolja lényegesen az AK-aktivitást és az L-lizin és L-treonin szinergetikus visszacsatolásos gátlásának hatástalanítását.

Egy p399AK9B mutáns lysC plazmidnak egy vad típusú Brevibacterium lactofermentum AJ12036 törzsbe (FERM BP–734) történő bevitelével kapott AJ12691 törzset 1992. április 10-én deponáltunk a FERM P–12918 szám alatt a National Institute of Bioscience and Human Technology of Agency of Industrial Science and Technology of Ministry of International Trade and Industry (postai cím: 305, 1–3 Higashi 1-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, Japán) gyűjteményben, majd a letétet 1995. február 10-én a Budapesti Szerződésnek megfelelő nemzetközi letétté alakítottuk, amelynek deponálási száma FERM-BP–4999.

(ii) dapB előállítása

A dapB-t tartalmazó DNS-fragmens előállítható egy korineform baktérium kromoszómájából a PCR-módszerrel. Ennek során tetszőleges DNS-donor felhasználható.

Példaként említhető a Brevibacterium lactofermentum ATCC 13 869 törzs.

A DDPR-t kódoló DNS-szekvencia ismert a Brevibacterium lactofermentum vonatkozásában [Journal of Bacteriology, 175(9), 2743–2749 (1993)], amelynek alapján előállíthatók PCR-módszerhez szükséges DNS-primerek. Ilyen DNS-primerként alkalmazható például 23 bázispárból álló DNS-szekvencia, így a szekvencialistában megadott 21- és 22-es számú szekvencia. A DNS előállítását, a PCR-módszert és a kapott dapB-t hordozó plazmid előállítását a lysC vonatkozásában ismertetett eljárásokkal végezzük.

A dapB-t tartalmazó DNS-fragmens nukleotidszekvenciáját és az ebből levezetett aminosavszekvenciát a 23-as számú szekvencia mutatja. Csak az aminosavszekvenciát tartalmazza a 24-es számú szekvencia. A fenti aminosavszekvenciát kódoló DNS-fragmensek mellett a találmány értelmében alkalmazhatók az olyan DNS-fragmens-ekvivalensek, amelyek a 24-es számú aminosavszekvenciával lényegében azonos aminosavszekvenciát kódolnak, nevezetesen például egy vagy több aminosav helyettesítésével, kiiktatásával vagy beépítésével kapott mutáns aminosavszekvenciákat, amennyiben a mutáció nem befolyásolja lényegesen a DDPR-aktivitást.

A dapB-t hordozó pCRDAPB plazmidnak E. coli JM109 törzsbe történő bevitelével előállított transzformáns AJ13107 törzset 1995. május 26-án deponáltuk FERM-BP 5114 szám alatt a National Institute of Bioscience and Human Technology of Agency of Industrial Science and Technology of Ministry of International Trade and Industry (postai cím: 305, 1–3 Higashi 1-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, Japán) gyűjteményben a Budapesti Szerződésnek megfelelően.

(iii) dapA előállítása

dapA-t tartalmazó DNS-fragmens állítható elő egy korineform baktérium kromoszómájából a PCR-módszerrel. Ennek során tetszőleges DNS-donor használható, előnyösen alkalmazható a Brevibacterium lactofermentum ATCC 13 869 törzs.

A DDPS-t kódoló DNS-szekvencia ismert a Corynebacterium glutamicum vonatkozásában [Nucleic Acids Research, 18(21), 6421 (1990); EMBL X53993], amelynek alapján a PCR-módszerhez szükséges DNS-primerek előállíthatók. Ilyen DNS-primerként alkalmazható például 23 bázispárból álló DNS-szekvencia, így a szekvencialistában megadott 17- és 18-as számú nukleotidszekvencia. A DNS előállítását, a PCR-módszert, és a kapott dapA-t tartalmazó plazmid előállítását a lysC ismertetésénél megadott módszerekkel végezzük.

A dapA-t tartalmazó DNS-fragmens nukleotidszekvenciáját és az ebből származó aminosavszekvenciát a 19-es számú szekvencia mutatja. Csak az aminosavszekvenciát mutatja a 20-as számú szekvencia. A fenti aminosavszekvenciát kódoló DNS-fragmensek mellett a találmány értelmében alkalmazhatók ekvivalens DNS-fragmensek is, amelyek a 20-as számú aminosavszekvenciával lényegében azonos aminosavszekvenciát kódolnak, nevezetesen például egy vagy több aminosav helyettesítésével, kiiktatásával vagy beépítésével kapott mutáns aminosavszekvenciát, amennyiben a mutáció nem befolyásolja lényegesen a DDPS-aktivitást.

A dapA-t hordozó pCRDAPA plazmidnak E. coli JM109 törzsbe történő bevitelével kapott transzformáns AJ13106 törzset 1995. május 26-án deponáltuk a FERM-BP–5113 szám alatt a National Institute of Bioscience and Human Technology of Agency of Industrial Science and Technology of Ministry of International Trade and Industry (postai cím: 305, 1–3 Higashi 1-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, Japán) gyűjteményben a Budapesti Szerződésnek megfelelően.

A lysA és ddh L-lizint termelő korineform baktériumban történő feldúsításának egyik megvalósítási módja során úgy járunk el, hogy a géneket egy plazmid vektor, transzpozon, fág vektor vagy hasonló eszköz segítésével visszük be a gazdasejtbe. A bevitel hatására bizonyos mértékű feldúsulás következik be kevés másolatot eredményező vektortípus alkalmazása esetén is. Elő-

nyösen azonban sok másolatot eredményező vektortípust használunk. Ilyen vektor például a fent ismertetett pAJ655, pAJ1844, pAJ611, pAJ3148 és pAJ440 plazmid vektor. Korineform baktériumból származó transzpozonokat ismertet a WO 92/02627, WO 93/18151, EP 445.385 és JP 6-46867 számú irat, valamint Vertes A. A. és munkatársai: Mol. Microbiol., 11, 739–746 (1994); Bonamy C. és munkatársai: Mol. Microbiol. 14, 571-581 (1994); Vertes A. A. és munkatársai: Mol. Gen. Genet., 245, 397–405 (1994); Jagar W. és munkatársai: FEMS Microbiology Letters, 126, 1–6 (1995); továbbá a JP 7-107976 és JP 7-327680 számú irat.

A találmány értelmében dúsított lysA-t és ddh-t tartalmazó korineform baktérium állítható elő például úgy, hogy egy gazdaként alkalmazott korineform baktériumba a sejtekben autonóm módon elszaporodó, és lysA-t és ddh-t tartalmazó rekombináns DNS-t viszünk be. A rekombináns DNS előállítható például úgy, hogy lysA-t és ddh-t inszertálunk egy vektorba, így valamely fent ismertetett plazmid vektorba, transzpozonba vagy fág vektorba.

Eljárhatunk úgy is, hogy az egyes lysA és ddh géneket egymás után visszük be a gazdasejtbe különböző vektorok alkalmazásával. Alternatív módon, két géntípus vihető be egyszerre egyetlen vektorral. Különböző vektorok alkalmazása esetén a géneket tetszőleges sorrendben visszük be, amelynek során előnyösen olyan vektorokat alkalmazunk, amelyek stabilan beépülnek és részt vesznek a gazdasejt működésében, és amelyek egymás mellett működőképesek.

Ha vektorként plazmidot alkalmazunk, akkor a rekombináns DNS a gazdasejtbe bevihető például az elektromos pulzálómódszerrel (JP 2-207791 számú irat). A gén transzpozonnal történő beviteléhez a transzpozont tartalmazó plazmidot bejuttatjuk a gazdasejtbe, és kiváltjuk a transzpozon transzponálását.

Hasonlóképpen, ha a korineform baktériumba mutáns lysC-t, dapA-t és dapB-t viszünk be, akkor az egyes gének és a lysA és ddh bevihető egymás után különböző vektorok alkalmazásával, vagy alternatív módon két vagy több gén bevihető együtt egyetlen vektorral.

3. L-lizin termelése

Az L-lizin hatékonyan termelhető az L-lizin bioszintézisében részt vevő fent ismertetett géneket dúsított formában tartalmazó korineform baktérium megfelelő közegen történő tenyésztésével, amelynek során a termelt L-lizint hagyjuk a tenyészetben felhalmozódni, majd az L-lizint a tenyészetből begyűjtjük.

Ennek során tenyészközegként alkalmazható bármely szokásos, szénforrást, nitrogénforrást, szervetlen iont és adott esetben más szerves komponenst tartalmazó közeg.

Szénforrásként alkalmazható például cukor, így glükóz, fruktóz, szacharóz, melasz és keményítőhidrolizátum, valamint szervetlen sav, így fumársav, citromsav és szukcinsav.

Nitrogénforrásként alkalmazható például szervetlen ammóniumsó, így ammónium-szulfát, ammónium-klorid és ammónium-foszfát, valamint szerves nitrogénvegyület, így szójabab-hidrolizátum, továbbá ammóniagáz és vizes ammónia.

Nyomnyi mennyiségben alkalmazott szerves tápanyagként előnyösen használható a B_1-vitamin, L-homoszerin, élesztőextraktum és hasonló anyagok. A fenti komponensek mellett kívánt esetben kis mennyiségű kálium-foszfátot, magnézium-szulfátot, vasiont, mangániont és hasonló anyagokat adunk a közeghez.

A tenyésztést előnyösen aerob körülmények között végezzük mintegy 30–90 órán keresztül. A tenyésztés hőmérséklete előnyösen 25–37 °C, amelynek során a tenyészetet előnyösen pH=5–8 értéken tartjuk. A pH-érték beállításához szervetlen vagy szerves anyagokat, savas vagy lúgos anyagokat vagy ammóniagázt adagolunk. Az L-lizin a tenyészetből begyűjthető a szokásos ioncserélő gyantákkal, kicsapásos módszerekkel és más ismert eljárásokkal.

A találmányt közelebbről az alábbi példákkal mutatjuk be anélkül, hogy az oltalmi kör a példákra korlátozódna.

1. példa

lysA előállítása Brevibacterium lactofermentumból

1. *lysA előállítása és lysA-t tartalmazó plazmid előállítása*

Kromoszomális DNS-donorként vad típusú Brevibacterium lactofermentum ATCC 13 869 törzset használunk. A kromoszomális DNS-t az ATCC 13 869 törzsből a szokásos módon állítjuk elő. A kromoszomális DNS-ből PCR-módszerrel argS-t, lysA-t tartalmazó DNS-fragmenst és ezeket tartalmazó operonnak megfelelő promotert állítunk elő. DNS-primerként szekvencialistában megadott 1-es és 2-es számú szekvenciának megfelelő 23 bázispárból álló DNS-szekvenciákat használjuk. Ily módon a Corynebacterium glutamicum ismert szekvenciájából kiindulva [Molecular Microbiology, 4(11), 1819–1830 (1990); Molecular and General Genetics., 212, 112–119 (1988)] arginil-tRNS-szintázt és DDC-t kódoló mintegy 3,6 kb szakaszt nyerünk.

DNS-t szintetizálunk a szokásos módon az Applied Biosystem, 380B típusú DNS-szintetizáló berendezésével a foszfoamiditmódszerrel [Tetrahedron Letters, 22, 1859 (1981)].

A géneket PCR-módszerrel alkalmazzuk a Takara Shuzo által forgalmazott DNA Thermal Cycler Model PJ2000 berendezéssel és Taq DNS-polimeráz alkalmazásával a gyártó előírásai szerint. A 3579 bp méretű génfragmens alkalmazásához pHSG399 klónozóvektort használunk. A pHSG399 vektort SmaI restrikciós enzimmel (Takara Shuzo) emésztjük, és az előállított lysA-t tartalmazó DNS-fragmenssel ligáljuk. Az így előállított, ATCC 13 869 törzsből származó lysA-t tartalmazó plazmid a p399LYSA jelet kapta.

A lysA-t tartalmazó DNS-fragmens extrahálásához a p399LYSA plazmidot KpnI enzimmel (Takara Shuzo) és BamHI enzimmel (Takara Shuzo) emésztjük. Ezt a DNS-fragmenst KpnI és BamHI enzimmel emésztett pHSG299 plazmiddal ligáljuk. A kapott plazmid jele p299LYSA. A p299LYSA előállítását az 1. ábra mutatja.

A p299LYSA plazmidba olyan DNS-fragmenst viszünk be, amely lehetővé teszi, hogy a plazmid Corynebacterium rendjébe tartozó baktériumban autonóm módon elszaporodjon (továbbiakban az ilyen DNS-fragmens jelölése Brevi.-ori). Így a Corynebacterium rendjébe tartozó baktériumban autonóm módon elszaporodó, és lysA-t hordozó plazmidot kapunk. A Brevi.-ori előállításához pHK4 plazmid vektort használunk, amely Brevi.-ori-t tartalmaz, és autonóm módon elszaporodik mind Escherichia coli-sejtekben, mind Corynebacterium rendbe tartozó baktérium sejtjeiben. A pHK4 plazmid vektor előállításához pHC4 plazmidot KpnI enzimmel (Takara Shuzo) és BamHI enzimmel (Takara Shuzo) emésztjük, a Brevi.-ori fragmenst extraháljuk, és KpnI és BamHI enzimekkel emésztett pHSG298 plazmiddal (JP 5–7491 számú irat) ligáljuk. A pHK4 plazmid vektor kanamicinrezisztenciát biztosít a gazdasejtben. A pHK4 plazmid vektort tartalmazó HB101 Escherichia coli az AJ13136 Escherichia coli jelet kapta, és a törzset 1995. augusztus 1-jén a FERM-BP–5186 számon deponáltuk a National Institute of Bioscience and Human Technology of Agency of Industrial Science and Technology of Ministry of International Trade and Industry (postai cím: 305, 1–3 Higashi 1-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, Japán) gyűjteményben.

A pHK4 plazmid vektort BamHI restrikciós enzimmel emésztjük, és a hasított végeket tompa végekké alakítjuk. Ezt DNA Blunting készlettel (Takar Shuzo) végezzük a gyártó előírásai szerint. A tompa végek kialakítása után foszforilezett KpnI linkert (Takara Shuzo) ligálunk. Ezzel a módosítással elérjük, hogy a Brevi.-ori szakasznak megfelelő DNS-fragmens a pHK4 plazmidból csak KpnI enzimmel végzett emésztéssel kivágható. Ezt a plazmidot KpnI enzimmel emésztjük, és a kapott Brevi.-ori DNS-fragmenst KpnI enzimmel emésztett p299LYSA plazmiddal ligáljuk, amelynek során lysA-t hordozó és korineform baktériumban automón módon szaporodó plazmidot kapunk. A kapott plazmid neve pLYSAB. A pLYSAB előállítását a 2. ábra mutatja.

2. *Brevibacterium lactofermentumból származó lysA nukleotidszekvenciájának meghatározása*

A p299LYSA plazmid DNS nukleotidszekvenciáját Sanger és munkatársai módszerével [például F. Sanger és munkatársai: Proc. Natl. Acad. Sci. 74, 5463 (1977)] végezzük. A meghatározott nukleotidszekvenciát és az ebből levezetett aminosavszekvenciát a 3-as számú szekvencia mutatja. A nukleotidszekvencia alapján az argS által kódolt aminosavszekvenciát és a lysA által kódolt aminosavszekvenciát a 4- és 5-ös számú szekvencia mutatja.

2. példa

ddh előállítása Brevibacterium lactofermentumból

A ddh gént a Brevibacterium lactofermentum ATCC 13 869 kromoszomális DNS-ében található ddh gén meghosszabbításával állítjuk elő a PCR-módszerrel. Ehhez két oligonukleotidprimert (6- és 7-es számú szekvencia) használunk, amiket a Corynebacterium glutamicum ddh génjének ismert nukleotidszekvenciája [Ishino S. és munkatársai: Nucleic Acids Res., 15, 3917 (1987)] alapján állítunk elő. A kapott meghosszabbított DNS-fragmenst EcoT22I és AvaI enzimmel emésztjük, és a hasított végeket tompa végekké alakítjuk. Ezután a fragmenst pMW119 SmaI helyére inszertálva pDDH plazmidot kapunk.

A pDDH plazmidot SalI és EcoRI enzimekkel emésztjük, majd a kapott végeket tompa végekké alakítjuk. A kapott fragmenst SmaI enzimmel emésztett pUC18 plazmiddal ligáljuk. Az így kapott plazmid jele pUC18DDH.

A pUC18DDH plazmidba Brevi.-ori-t viszünk be, amellyel olyan plazmidot kapunk, amely ddh gént tartalmaz, és korineform baktériumban autonóm módon szaporodik. A pHK4 plazmidot KpnI és BamHI enzimekkel emésztjük, és a kapott végeket tompa végekké alakítjuk. Ehhez DNA Blunting készletet (Takar Shuzo) használunk a gyártó előírásai szerint. Ezután foszforilezett PstI linkert (Takara Shuzo) ligálunk úgy, hogy ezt pHSG299 plazmid PstI helyére inszertáljuk. A kapott plazmid jele pPK4. A pUC18DDH plazmidot XbaI és KpnI enzimekkel emésztjük, és a kapott fragmenst KpnI és XbaI enzimekkel emésztett pPK4 plazmiddal ligáljuk. Így pPK4D plazmidot kapunk, amely tartalmazza a ddh gént, és korineform baktériumban autonóm módon szaporodik. A plazmid előállítását a 3. ábra mutatja.

3. példa

ddh és lysA gént tartalmazó plazmid előállítása

A ddh gént tartalmazó pUC18DDH plazmidot EcoRI enzimmel emésztjük, a kapott végeket tompa végekké alakítjuk, majd XbaI enzimmel emésztjük, és így extraháljuk a ddh gént tartalmazó DNS-fragmenst. Ezt a ddh fragmenst lysA gént tartalmazó p391LYSA plazmiddal ligáljuk, amit előzetesen BamHI enzimmel emésztünk, a végeket tompa végekké alakítjuk és XbaI enzimmel tovább emésztjük. A kapott plazmid jele p399DL, a folyamatot a 4. ábra mutatja.

Ezután a p399DL plazmidba Brevi.-ori-t viszünk be. Ehhez a pHK4 plazmidot XbaI és BamHI enzimekkel emésztjük, és a hasított végeket tompa végekké alakítjuk. Ezután egy foszforilezett XbaI linkert ligálunk, és így lehetővé tesszük, hogy a Brevi.-ori szakasznak megfelelő DNS-fragmens kivágható legyen a pHK4 plazmidból XbaI enzimmel önmagában végzett emésztéssel. A plazmidot végül XbaI enzimmel emésztjük, és a kapott Brevi.-ori DNS-fragmenst XbaI enzimmel emésztett p399DL plazmiddal ligáljuk. A kapott pDL plazmid ddh és lysA géneket tartalmaz, és korineform baktériumban autonóm módon szaporodik. A folyamatot az 5. ábra mutatja.

4. példa

Mutáns lysC, dapA és dapB előállítása Brevibacterium lactofermentumból

1. *Vad típusú lysC gén és mutáns lysC gén előállítása Brevibacterium lactofermentumból*

(1) Vad típusú és mutáns lysC gének előállítása és ezeket tartalmazó plazmidok előállítása

A kromoszomális DNS donoraként Brevibacterium lactofermentum ATCC 13 869 törzset és az ATCC

13 869 törzsből kifejlesztett L-lizint termelő mutáns AJ3445 törzset (FERM P–1944) használjuk. Az AJ3445 törzset úgy mutáltuk, hogy a lysC gén vonatkozásában lényegében hatástalanítottuk a lizin és treonin együttes gátlását [Journal of Biochemistry, 68, 701–710 (1970)].

A lysC gént tartalmazó DNS-fragmenst kromoszomális DNS-ből állítjuk elő PCR-módszerrel [polimerázláncreakció; White T. J. és munkatársai: Trands Genet., 5, 185 (1989)]. Ehhez DNS-primerként 23 bázispárt és 21 bázispárt tartalmazó egyszálú DNS-szekvenciákat alkalmazunk, amiket a 10- és 11-es számú szekvencia mutat. Így lysC gént kódoló mintegy 1643 bp méretű szakaszt kapunk a Corynebacterium glutamicum ismert szekvenciája alapján [Molecular Microbiology, 5(5), 1197–1204 (1991); Mol. Gen. Genet., 224, 317–324 (1990)].

Az 1643 kb méretű génfragmenst agaróz-gélelektroforézissel ellenőrizzük. A gélről eltávolított fragmenst a szokásos módon tisztítjuk, majd NruI enzimmel (Takara Shuzo) és EcoRI enzimmel (Takara Shuzo) emésztjük.

A génfragmens klónozóvektoraként pHSG399 plazmidot [Takeshita S. és munkatársai: Gene, 61, 63–74 (1987)] alkalmazunk. A pHSG399 plazmidot SmaI enzimmel (Takara Shuzo) és EcoRI enzimmel emésztjük, és a kapott lysC fragmenssel ligáljuk. A ligálást DNS-ligáló készlettel (Takara Shuzo) végezzük a gyártó előírásai szerint, így olyan plazmidokat kapunk, amelyekben a Brevibacterium lactofermentum kromoszómájából származó lysC fragmens pHSG399 plazmiddal van ligálva. Az ATCC 13 869 törzsből (vad típus) lysC gént tartalmazó plazmid jele p399AKY, és az AJ3463 törzsből (L-lizint termelő baktérium) származó lysC gént tartalmazó plazmid jele p399AK9.

A kapott p399AKY és p399AK9 plazmidokba Brevi.-ori szakaszt viszünk be, és így olyan plazmidot kapunk, amely lysC gént tartalmaz, és korineform baktériumban autonóm módon szaporodik.

Ehhez pHK4 plazmidot KpnI és BamHI enzimmel (Takara Shuzo) emésztünk, és a hasított végeket tompa végekké alakítjuk. Ezt DNA Blunting készlettel (Takara Shuzo) végezzük a gyártó előírásai szerint. Ezután foszforilezett BamHI linkert (Takara Shuzo) ligálunk, amellyel elérhető, hogy a Brevi.-ori szakasznak megfelelő DNS-fragmens a pHK4 plazmidból BamHI enzimmel önmagában végzett emésztéssel eltávolítható. A kapott plazmidot BamHI enzimmel emésztjük, és a kapott Brevi.-ori DNS-fragmenst p399AKY és p399AK9 plazmiddal ligáljuk, amelyeket előzetesen BamHI enzimmel emésztünk. A kapott plazmidok lysC gént tartalmaznak, és korineform baktériumban autonóm módon szaporodnak.

A p399AKY plazmidból származó vad típusú lysC gént tartalmazó plazmid jele p399AKYB, és a p399AK9 plazmidból származó mutáns lysC gént tartalmazó plazmid jele p399AK9B. A folyamatot a 6. ábra mutatja. A mutáns lysC gént tartalmazó p399AK9B plazmidnak vad típusú Brevibacterium lactofermentum törzsbe (AJ12036 törzs, FERM BP–734) történő beviteléve kapott AJ12691 törzset 1992. április 10-én deponáltuk FERM P–12918 szám alatt a National Institute of Bioscience and Human Technology of Agency of Industrial Science and Technology of Ministry of International Trade and Industry (postai cím: 305, 1–3 Higashi 1-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, Japán), majd a letétet 1995. február 10-én a Budapesti Szerződésnek megfelelő nemzetközi letétté alakítottuk, amelynek száma FERM BP–4999.

(2) Brevibacterium lactofermentumból származó vad típusú lysC és mutáns lysC nukleotidszekvenciájának meghatározása

A megfelelő transzformánsokból vad típusú lysC gént tartalmazó p399AKY plazmidot és mutáns lysC gént tartalmazó p399AK9 plazmidot állítunk elő a vad típusú és a mutáns lysC gének nukleotidszekvenciájának meghatározásához. A nukleotidszekvencia meghatározását Sanger és munkatársai módszerével [például F. Sanger és munkatársai: Proc. Natl. Acad. Sci. 74, 5463 (1977)] végezzük.

A p399AKY plazmid által kódolt vad típusú lysC nukleotidszekvenciáját a szekvencialistában megadott 12-es számú szekvencia mutatja. A p399AK9 plazmid által kódolt mutáns lysC gén nukleotidszekvenciája csak egy nukleotid megváltozását mutatja a vad típusú lysC génhez viszonyítva, és ez az 1051. helyen található G, ami A-ra változott. Ismert, hogy a Corynebacterium glutamicum lysC génje két alegységből áll (α és β), amelyeket azonos DNS-szálon található azonos leolvasókeret kódol [Kalinowski J. és munkatársai: Molecular Microbiology, 5(5), 1197–1204 (1991)]. A homológia ellenőrzése alapján feltételezhető, hogy az adott gén szintén két alegységből áll (α és β), amelyeket azonos DNS-szálon található azonos leolvasókeret kódol.

A vad típusú AK-fehérje α-alegységének a DNS nukleotidszekvenciájából levezetett aminosavszekvenciáját a 13-as számú szekvencia mutatja a DNS-szekvenciával együtt. Csak az aminosavszekvenciát mutatja a 14-es számú szekvencia. A vad típusú AK-fehérje β-alegységének a DNS nukleotidszekvenciájából levezetett aminosavszekvenciáját a 15-ös számú szekvencia mutatja a DNS-szekvenciával együtt. Csak az aminosavszekvenciát mutatja a 16-os számú szekvencia. Mindkét alegységben GTG szolgál iniciátorkodonként, és a megfelelő aminosav metionin. Az ismertetés azonban metioninra, valinra vagy formil-metioninra vonatkozik.

A mutáns lysC szekvenciájában bekövetkezett változás aminosavcserét eredményez, ami azt jelenti, hogy a 279. alaninmaradék helyett az a alegységben treoninmaradék áll, és a 30. alaninmaradék helyett a β-alegységben treoninmaradék található a vad típusú AK-fehérje aminosavszekvenciájában (14- és 16-os számú szekvencia).

2. *dapB előállítása Brevibacterium lactofermentumból*

(1) dapB előállítása és ezt tartalmazó plazmid előállítása

Kromoszomális DNS-donorként vad típusú Brevibacterium lactofermentum ATCC 13 869 törzset használunk. A kromoszomális DNS-t az ATCC 13 869 törzsből a szokásos módon állítjuk elő. A dapB

gént tartalmazó DNS-fragmenst a kromoszomális DNS-b[l PCR-módszerrel állítjuk elő. Ennek során DNS-primerként 23 bázispárból álló DNS-szekvenciákat alkalmazunk, amiket a 21-es és 22-es számú szekvencia mutat. Így a DDPR gént kódoló mintegy 2,0 kb méretű szakaszt kapunk a Brevibacterium lactofermentum ismert szekvenciája alapján [Journal of Bacteriology, 157(9), 2743–2749 (1993)]. A DNS szintézisét és a PCR-módszert az 1. példában leírt módon végezzük. A 2001 bp méretű génfragmens előállításához pCR-Script klónozóvektort (Invitrogen) használunk, és ezt a dapB fragmenssel ligáljuk. Így olyan plazmidot kapunk, amely a Brevibacterium lactofermentum kromoszómájából származó 2001 bp dapB fragmenst tartalmazza a pCR-Script vektorral ligálva. Az így kapott plazmid, amely ATCC 13 869 törzsből származó dapB gént tartalmaz, a pCRDAPB jelet kapta. A pCRDAPB plazmidnak E. coli JM109 törzsbe történő bevitelével kapott transzformáns AJ13107 törzset 1995. május 26-án deponáltuk a FERM BP–5114 szám alatt a National Institute of Bioscience and Human Technology of Agency of Industrial Science and Technology of Ministry of International Trade and Industry (postai cím: 305, 1–3 Higashi 1-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, Japán) gyűjteményben a Budapesti Szerződés előírásai szerint.

A DDPR szerkezeti génjét tartalmazó 1101 bp fragmens előállításához pCRDAPB plazmidot EcoRV és SphI enzimekkel emésztjük. A fragmenst HincII és SphI enzimekkel emésztett pHSG399 plazmiddal ligálva p399DPR plazmidot kapunk.

A p399DPR plazmidba Brevi.-ori szakaszt beépítve olyan plazmidot kapunk, amely dapB gént tartalmaz, és korineform baktériumban autonóm módon szaporodik. Ehhez a pHK4 plazmidot KpnI enzimmel (Takara Shuzo) emésztjük, és a hasított végeket tompa végekké alakítjuk. Ezt DNA Blunting készlettel (Takara Shuzo) végezzük a gyártó előírásai szerint. Ezután foszforilezett BamHI linkert (Takara Shuzo) ligálunk, és így elérjük, hogy a Brevi.-ori szakasznak megfelelő DNS-fragmens a pHK4 plazmidból BamHI enzimmel önmagában végzett emésztéssel kivágható. A plazmidot BamHI enzimmel emésztjük, és a kapott Brevi.-ori DNS-fragmens BamHI enzimmel emésztett p399DPR plazmiddal ligáljuk. A kapott pDPRB plazmid dapB gént tartalmaz, és korineform baktériumban autonóm módon szaporodik. A folyamatot a 7. ábra mutatja.

(2) Brevibacterium lactofermentumból származó dapB nukleotidszekvenciájának meghatározása

A p399DPR plazmidot hordozó AJ13107 törzsből plazmid DNS-t állítunk elő, és nukleotidszekvenciáját az 1. példában leírt módon meghatározzuk. A kapott nukleotidszekvenciát és az ebből levezetett aminosavszekvenciát a 23-as számú szekvencia mutatja. Csak az aminosavszekvenciát mutatja a 24-es számú szekvencia.

3. *dapA előállítása Brevibacterium lactofermentumból*

(1) dapA előállítása és ezt tartalmazó plazmid előállítása

Kromoszómális DNS-donorként vad típusú Brevibacterium lactofermentum ATCC 13 869 törzset használunk. A kromoszómális DNS-t a szokásos módon állítjuk elő. A kromoszómális DNS-ből dapA gént tartalmazó DNS-fragmenst állítunk elő PCR-módszerrel. Ennek során DNS-primerként 23 bázispárból álló DNS-szekvenciákat alkalmazunk, amiket a 17-es és 18-as számú szekvencia mutat. Így DBPS gént kódoló mintegy 1,5 kd szakaszt kapunk a Corynebacterium glutamicum ismert szekvenciája [Nucleic Acids Research, 18(21), 6421 (1990); EMBL X53993] alapján. A DNS szintézisét és a PCR-módszert az 1. példában leírt módon végezzük. Az 1411 bp génfragmenshez pCR1000 klónozóvektort [Invitrogen, BioTechnology, 9, 657–663 (1991)] használunk, és a kapott dapA fragmenssel ligáljuk. A DNS ligálását DNS-ligáló készlettel (Takara Shuzo) végezzük a gyártó előírásai szerint. Így olyan plazmidot kapunk, amelyben a Brevibacterium lactofermentum kromoszómájából származó 1411 bp dapA fragmens pCR1000 vektorral van ligálva. Az így kapott plazmid, amely ATCC 13 869 törzsből származó dapA gént tartalmaz, a pCRDAPA jelet kapta.

A pCRDAPA plazmidot E. coli JM109 törzsbe bevive előállított transzformáns AJ13106 törzset 1995. május 26-án deponáltuk a FERM BP–5113 szám alatt a National Institute of Bioscience and Human Technology of Agency of Industrial Science and Technology of Ministry of International Trade and Industry (postai cím: 305, 1–3 Higashi 1-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, Japán) gyűjteményben a Budapesti Szerződés előírásai szerint.

A pCRDAPA plazmidba Brevi.-ori szakaszt bevive olyan szakaszt kapunk, amely dapA gént tartalmaz, és korineform baktériumban autonóm módon szaporodik. Ehhez a pHK4 plazmidot KpnI és BamHI enzimekkel (Takara Shuzo) emésztjük, és a hasított végeket tompa végekké alakítjuk. A tompa végek kialakítását DNA Blunting készlettel (Takara Shuzo) végezzük a gyártó előírásai szerint. Ezután foszforilezett SmaI linkert (Takara Shuzo) ligálunk, és ezzel elérjük, hogy a Brevi.-ori szakaszt tartalmazó DNS-fragmens a pHK4 plazmidból SmaI enzimmel önmagában végzett emésztéssel kivágható. A plazmidot SmaI enzimmel emésztjük, és a kapott Brevi.-ori DNS-fragmenst SmaI enzimmel emésztett pCRDAPA plazmiddal ligáljuk. A kapott pDPSB plazmid dapA gént tartalmaz, és korineform baktériumban autonóm módon szaporodik. A folyamatot a 8. ábra mutatja.

(2) Brevibacterium lactofermentumból származó dapA nukleotidszekvenciájának meghatározása

A pCRDAPA plazmidot tartalmazó AJ13106 törzsből plazmid DNS-t állítunk elő, és nukleotidszekvenciáját az 1. példában leírt módon meghatározzuk. A kapott nukleotidszekvenciát és az ebből származó aminosavszekvenciát a 19-es számú szekvencia mutatja. Csak az aminosavszekvenciát mutatja a 20-as számú szekvencia.

4. *Mutáns lysC és dapA gént tartalmazó plazmid előállítása*

Korineform baktériumból származó mutáns lysC és dapA gént és replikációs origót tartalmazó plazmidot állítunk elő dapA gént tartalmazó pCRDAPA plazmid-

ból, és mutáns lysC gént és Brevi.-ori szakaszt tartalmazó p399AK9B plazmidból. A p399AK9B plazmidot SalI enzimmel teljesen emésztjük, és a hasított végeket tompa végekké alakítjuk. Egy EcoRI linkert ligálunk, és így a plazmidban a SalI helyet EcoRI hellyé alakítjuk. A kapott plazmid a p399AK9BSE jelet kapta. A p399AK9BSE plazmidot EcoRI enzimmel részlegesen emésztve egy fragmensként kivágjuk a mutáns lysC gént, és Brevi.-ori szakaszt. Ezt a fragmenst EcoRI enzimmel emésztett pCRDAPA plazmiddal ligáljuk. A kapott plazmid a pCRCAB jelet kapta. Ez a plazmid E. coliban és korineform baktériumban autonóm módon szaporodik, és kanamicinrezisztenciát biztosít. A plazmid tartalmazza a mutáns lysC gént és a dapA gént. A folyamatot a 9. ábra mutatja.

5. *Mutáns lysC gént és dapB gént tartalmazó plazmid előállítása*

Mutáns lysC gént és dapB gént tartalmazó plazmidot állítunk elő a mutáns lysC gént tartalmazó p399AK9 plazmidból és a dapB gént tartalmazó p399DPR plazmidból. A p399DPR plazmidot EcoRV és SphI enzimekkel emésztve DDPR szerkezeti gént tartalmazó 1101 bp fragmenst kapunk. Ezt a fragmenst olyan p399AK9 plazmiddal ligáljuk, amit előzetesen SalI enzimmel emésztünk, a hasított végeket tompa végekké alakítjuk, majd SphI enzimmel tovább emésztjük. A kapott p399AKDDPR plazmid tartalmazza a mutáns lysC gént és a dapB gént.

A kapott p399AKDDPR plazmidba Brevi.-ori szakaszt viszünk be. Ehhez a pHK4 plazmidot KpnI enzimmel (Takara Shuzo) emésztjük, és a hasított végeket tompa végekké alakítjuk. Ehhez DNA Blunting készletet (Takara Shuzo) használunk a gyártó előírásai szerint. Ezután foszforilezett BamHI linkert (Takara Shuzo) ligálunk, és így elérjük, hogy a Brevi.-ori szakasznak megfelelő DNS-fragmens a pHK4 plazmidból BamHI enzimmel önmagában végzett emésztéssel kivágható. A plazmidot BamHI enzimmel emésztjük, és a kapott Brevi.-ori DNS-fragmenst BamHI enzimmel emésztett p399AKDDPR plazmiddal ligáljuk. A kapott pCB plazmid tartalmazza a mutáns lysC gént és a dapB gént, és korineform baktériumban autonóm módon szaporodik. A folyamatot a 10. ábra mutatja.

6. *dapA gént és dapB gént tartalmazó plazmid előállítása*

A dapA gént tartalmazó pCRDAPA plazmidot KpnI és EcoRI enzimmel emésztve eltávolítjuk a dapA gént tartalmazó DNS-fragmenst. A fragmenst KpnI és EcoRI enzimekkel emésztett pHSG399 vektorplazmiddal ligáljuk. A kapott plazmid jele p399DPS.

A dapB gént tartalmazó pCRDAPB plazmidot SacII és EcoRI enzimekkel emésztve kivágjuk a DDPR gént kódoló 2,0 kb DNS-fragmenst. A fragmenst SacII és EcoRI enzimekkel emésztett p399DPS plazmiddal ligáljuk. A kapott p399AB plazmid tartalmazza a dapA gént és a dapB gént.

A p399AB plazmidba Brevi.-ori szakaszt viszünk be. Ehhez a pHK4 plazmidot BamHI enzimmel (Takara Shuzo) emésztjük, és a hasított végeket tompa végekké alakítjuk. Ezt DNA Blunting készlettel (Takara Shuzo) végezzük a gyártó előírásai szerint. Ezután foszforilezett KpnI linkert (Takara Shuzo) ligálunk, és így elérjük, hogy a Brevi.-ori szakasznak megfelelő DNS-fragmens a pHK4 plazmidból KpnI enzimmel önmagában végzett emésztéssel kivágható. A plazmidot KpnI enzimmel emésztjük, és a kapott Brevi.-ori DNS-fragmenst KpnI enzimmel emésztett p399AB plazmiddal ligáljuk. A kapott pAB plazmid tartalmazza a dapA gént és a dapB gént, és korineform baktériumban autonóm módon szaporodik. A folyamatot a 11. ábra mutatja.

7. *Mutáns lysC gént, dapA gént és dapB gént tartalmazó plazmid előállítása*

A p399DPS plazmidot EcoRI és SphI enzimekkel emésztjük, és a hasított végeket tompa végekké alakítjuk. Így dapA génfragmenst kapunk. Ezt a fragmenst olyan p399AK9 plazmiddal ligáljuk, amit előzetesen SalI enzimmel emésztünk, és a hasított végeket tompa végekké alakítjuk. A kapott p399CA plazmid tartalmazza a mutáns lysC gént és a dapA gént.

A dapB gént tartalmazó pCRDAPB plazmidot EcoRI enzimmel emésztjük, a hasított végeket tompa végekké alakítjuk, és SacI enzimmel tovább emésztjük. Így dapB gént tartalmazó 2,0 kb DNS-fragmenst kapunk. A dapA gént és a mutáns lysC gént tartalmazó p399CA plazmidot SpeI enzimmel emésztjük, a hasított végeket tompa végekké alakítjuk, majd SacI enzimmel tovább emésztjük. A kapott fragmenst az extrahált dapB fragmenssel ligálva p399CAB plazmidot kapunk, amely tartalmazza a mutáns lysC gént, a dapA gént és a dapB gént.

A p399CAB plazmidba Brevi.-ori szakaszt viszünk be. Ehhez a pHK4 plazmidot BamHI enzimmel (Takara Shuzo) emésztjük, és a hasított végeket tompa végekké alakítjuk. Ezt DNA Blunting készlettel (Takara Shuzo) végezzük a gyártó előírásai szerint. Ezután foszforilezett KpnI linkert (Takara Shuzo) ligálunk, és így biztosítjuk, hogy a Brevi.-ori szakasznak megfelelő DNS-fragmens a pHK4 plazmidból KpnI enzimmel önmagában végzett emésztéssel kivágható. A plazmidot KpnI enzimmel emésztjük, és a Brevi.-ori DNS-fragmenst KpnI enzimmel emésztett p399CAB plazmiddal ligáljuk. A kapott pCAB plazmid mutáns lysC gént, dapA gént és dapB gént tartalmaz, és korineform baktériumban autonóm módon szaporodik. A folyamatot a 12. ábra mutatja.

8. *Mutáns lysC gént, dapA gént, dapB gént és lysA gént tartalmazó plazmid előállítása*

A lysA gént tartalmazó p299LYSA plazmidot KpnI és BamHI enzimekkel emésztjük, és a hasított végeket tompa végekké alakítjuk. A kapott lysA génfragmenst olyan pCAB plazmiddal ligáljuk, amit előzetesen HpaI enzimmel (Takara Shuzo) emésztünk, és a hasított végeket tompa végekké alakítjuk. A kapott pCABL plazmid mutáns lysC gént, dapA gént, dapB gént és lysA gént tartalmaz, és korineform baktériumban autonóm módon szaporodik. A folyamatot a 13. ábra mutatja. Megjegyezzük, hogy a lysA génfragmenst a pCABL plazmidban a dapB gént tartalmazó DNS-fragmens HpaI helyére ligáltuk, de a HpaI hely a dapB génre vonatkozó promoter felett (a 23-as számú szekvenciában

611–616. számú nukleotid) helyezkedik el, és a dapB gén nincs kettévágva.

9. *Mutáns lysC gént, dapA gént, dapB gént, ddh gént és lysA gént tartalmazó plazmid előállítása*

A pHSG299 plazmidot XbaI és KpnI enzimekkel emésztjük, és XbaI és KpnI enzimekkel emésztett p399DL plazmiddal ligáljuk, amely tartalmazza a ddh gént és a lysA gént. A kapott plazmid jele p299DL. A p299DL plazmidot XbaI és KpnI enzimekkel emésztjük, és a hasított végeket tompa végekké alakítjuk. Így eltávolítjuk a ddh gént és a lysA gént tartalmazó DNS-fragmenst. Ezt a DNS-fragmenst olyan pCAB plazmiddal ligáljuk, amely tartalmazza a mutáns lysC gént, a dapA gént és a dapB gént, és amit előzetesen HpaI enzimmel emésztünk, és a hasított végeket tompa végekké alakítjuk. A kapott pCABDL plazmid tartalmazza a mutáns lysC gént, dapA gént, dapB gént, lysA gént és ddh gént, és korineform baktériumban autonóm módon szaporodik. A folyamatot a 14. ábra mutatja.

5. példa

Az L-lizin bioszintézisében részt vevő géneket tartalmazó plazmidok bevitele L-lizint termelő Brevibacterium lactofermentum baktériumba

A fent leírt módon előállított, az L-lizin bioszintézisében részt vevő géneket tartalmazó plazmidokat, nevezetesen a pLYSAB (CM^r), pPK4D (Cm^r), p399AK9B (Cm^r), pDPSB (Km^r), pDPRB (Cm^r), pCRCAB (Km^r), pAB (Cm^r), pDL (Cm^r), pCB (Cm^r), pCAB (Cm^r), pCABL (Cm^r) és pCABDL (Cm^r) plazmidokat L-lizint termelő Brevibacterium lactofermentum AJ11082 baktériumokba (NRRL B–11470) visszük be. Az AJ11082 törzs AEC-rezisztens. A plazmidok bevitelét elektromos pulzálómódszerrel (JP 2–207791 számú irat) végezzük. A transzformánsokat a megfelelő plazmid által biztosított hatóanyagrezisztencia marker alapján szelektáljuk. A transzformánsok szelektálását 50 μg/ml kloramfenikolt tartalmazó teljes közegen végezzük, ha kloramfenikol-rezisztens gént tartalmazó plazmidot viszünk be, illetve 25 μg/ml kanamicint tartalmazó teljes közegen végezzük, ha kanamicinrezisztencia-gént tartalmazó plazmidot viszünk be.

6. példa

L-lizin termelése

Az 5. példa szerint előállított transzformánsokat L-lizin-termelő közegen tenyésztjük az L-lizin-termelő képesség vizsgálatához.

Az L-lizin-termelő közeg előállításához az alább felsorolt komponenseket a kalcium-karbonát kivételével feloldjuk, és kálium-hidroxiddal pH=8,0 értékre állítjuk. A közeget 115 °C hőmérsékleten 15 percen keresztül sterilizáljuk, majd a sterilizált közeghez száraz állapotban hozzáadjuk a forró levegővel külön sterilizált kalcium-karbonátot. Az L-lizin-termelő közeg összetétele 1 literre számolva:

glükóz	100 g
$(NH_4)_2SO_4$	55 g
KH_2PO_4	1 g
$MgSO_4 \times 7H_2O$	1 g
biotin	500 μg
tiamin	2000 μg
$FeSO_4 \times 7H_2O$	0,01 g
$MnSO_4 \times 7H_2O$	0,01 g
nikotinamid	5 mg
fehérjehidrolizátum (Mamenou)	30 ml
kalcium-karbonát	50 g.

Az egyes transzformánsokat és a szülőtörzset a fenti összetételű közegre inokuláljuk, és ismételt rázás közben 31,5 °C hőmérsékleten tenyésztjük. A tenyésztés során termelt L-lizin mennyiségét 40 óra és 72 óra elteltével mérjük. A 72 óra elteltével mért növekedést (OD_{562}) az L-lizin mennyiségével együtt az 1. táblázatban adjuk meg. A táblázatban lysC* jelentése mutáns lysC. A növekedés kvantitatív méréséhez 560 nm hullámhosszon 101-szeres hígítás után mérjük a zavarosságot.

Baktériumtörzs/plazmid	Bevitt gén	L-lizin termelése (g/l)		Növekedés (OD_{562}/101)
		40 óra	72 óra	
AJ11082		22,0	29,8	0,450
AJ11082/pLYSAB	lysA	19,8	32,5	0,356
AJ11082/pKD4D	ddh	19,0	33,4	0,330
AJ11082/p399AK9B	lysC*	16,8	34,5	0,398
AJ11082/pDPSB	dapA	18,7	33,8	0,410
AJ11082/pDPRB	dapB	19,9	29,9	0,445
AJ11082/pCRCAB	lysC*, dapA	19,7	36,5	0,360
AJ11082/pAB	dapA, dapB	19,0	34,8	0,390
AJ11082/pDL	lysA, ddh	23,3	31,6	0,440
AJ11082/pCB	lysC*, dapB	23,3	35,0	0,440
AJ11082/pCAB	lysC*, dapA, dapB	23,0	45,0	0,425
AJ11082/pCABL	lysC*, dapA, dapB, lysA	26,2	46,5	0,379
AJ11082/pCABDL	lysC*, dapA, dapB, lysA, ddh	26,5	47,0	0,409

Láthatjuk, hogy a lysA, ddh, mutáns lysC, dapA vagy dapB gének önmagában történő dúsítása esetén a 72 óra alatt termelt L-lizin mennyisége nagyobb vagy azonos a szülőtörzs által termelt L-lizin mennyiségével, míg a 40 óra elteltével termelt L-lizin mennyisége kisebb, mint a szülőtörzsnél. Ez azt jelenti, hogy az L-lizin termelésének sebessége rövid tenyészidő alatt lecsökken. Hasonló módon, mutáns lysC és dapA gén, vagy dapA és dapB gén feldúsítása esetén a 72 óra alatt termelt L-lizin menynyisége nagyobb, mint a szü-

lőtörzs esetén, de a 40 óra alatt termelt L-lizin mennyisége kisebb, mint a szülőtörzs esetén. Az L-lizin termelésének sebessége tehát itt is csökken.

Ha azonban a lysA és ddh gének kombinációját dúsítjuk fel, a növekedés javul, az L-lizin termelésének sebessége rövid tenyészidő alatt is változatlan marad, és az L-lizin felhalmozott mennyisége hosszú időn keresztül történő tenyésztés esetén szintén javul.

Az olyan törzsnél, amelyben a dapB gént a mutáns lysC génnel együtt, és az olyan törzsnél, ahol a fenti géneket a dapA génnel együtt dúsítottuk, a növekedés szintén javul, és az L-lizin termelésének sebessége fokozódik az eredeti törzshöz képest. Az olyan törzsnél, amelyben a fent említett három gént dúsítottuk, mind az L-lizin termelésének sebessége, mind a felhalmozott L-lizin mennyisége tovább fokozható a lysA gén és a ddh gén további dúsításával.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Korineform baktériumok sejtjeiben autonóm módon kifejeződő rekombináns DNS, *azzal jellemezve,* hogy diamino-pimelát-dekarboxilázt kódoló DNS-szekvenciát és diamino-pimelát-dehidrogenázt kódoló DNS-szekvenciát tartalmaz.

2. Az 1. igénypont szerinti rekombináns DNS, *azzal jellemezve,* hogy diamino-pimelát-dekarboxilázt kódoló DNS-szekvenciaként a szekvencialistában megadott 5. számú aminosavszekvenciát vagy ezzel lényegében azonos aminosavszekvenciát kódoló DNS-szekvenciát tartalmaz.

3. Az 1. igénypont szerinti rekombináns DNS, *azzal jellemezve,* hogy diamino-pimelát-dehidrogenázt kódoló DNS-szekvenciaként a szekvencialistában megadott 9. számú aminosavszekvenciát, vagy ezzel lényegében azonos aminosavszekvenciát kódoló DNS-szekvenciát tartalmaz.

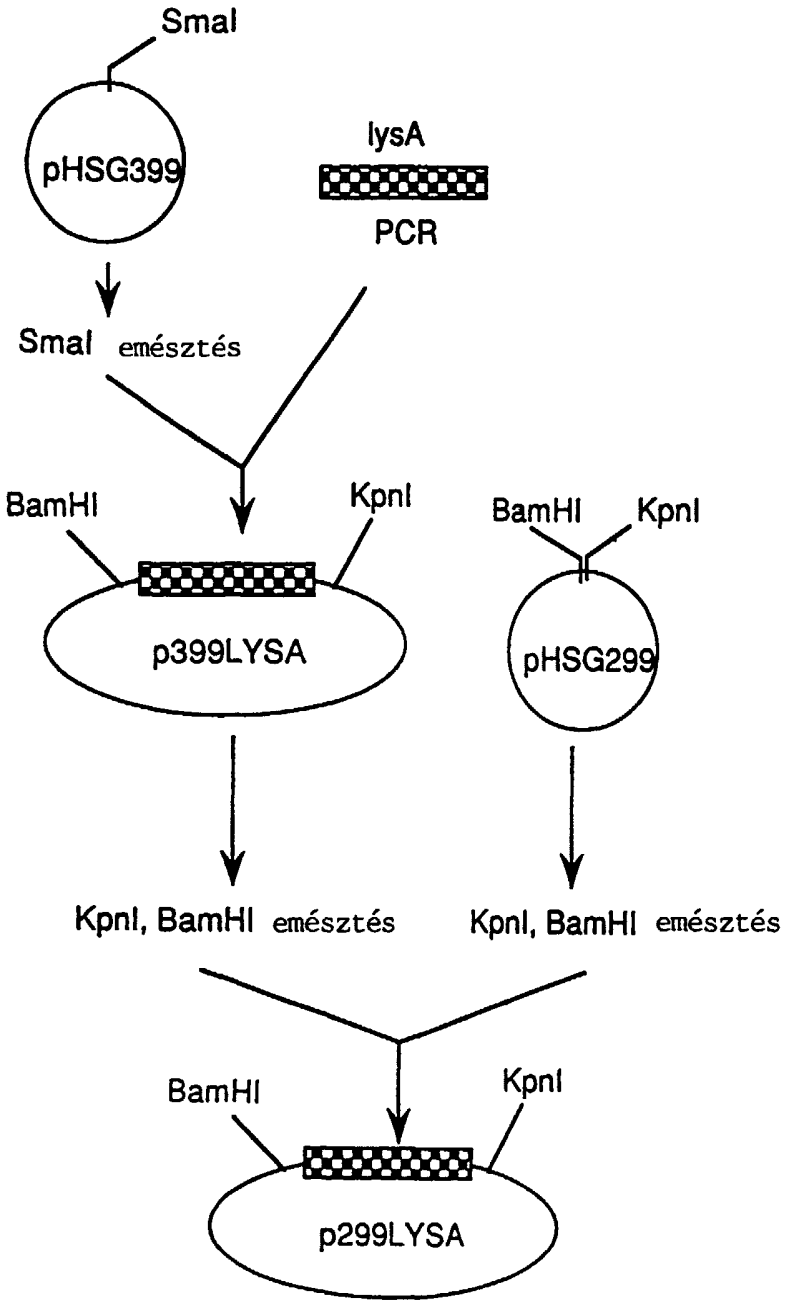
4. Korineform baktérium, *azzal jellemezve,* hogy a DNS-szekvenciák másolatai számának növelése, erős promoter használata vagy ezek kombinációja következtében fokozott mértékben expresszálódó diamino-pimelát-dekarboxilázt kódoló DNS-szekvenciát és diamino-pimelát-dehidrogenázt kódoló DNS-szekvenciát tartalmaz.

5. A 4. igénypont szerinti korineform baktérium, *azzal jellemezve,* hogy az 1–3. igénypontok bármelyike szerinti rekombináns DNS bevitelével van transzformálva.

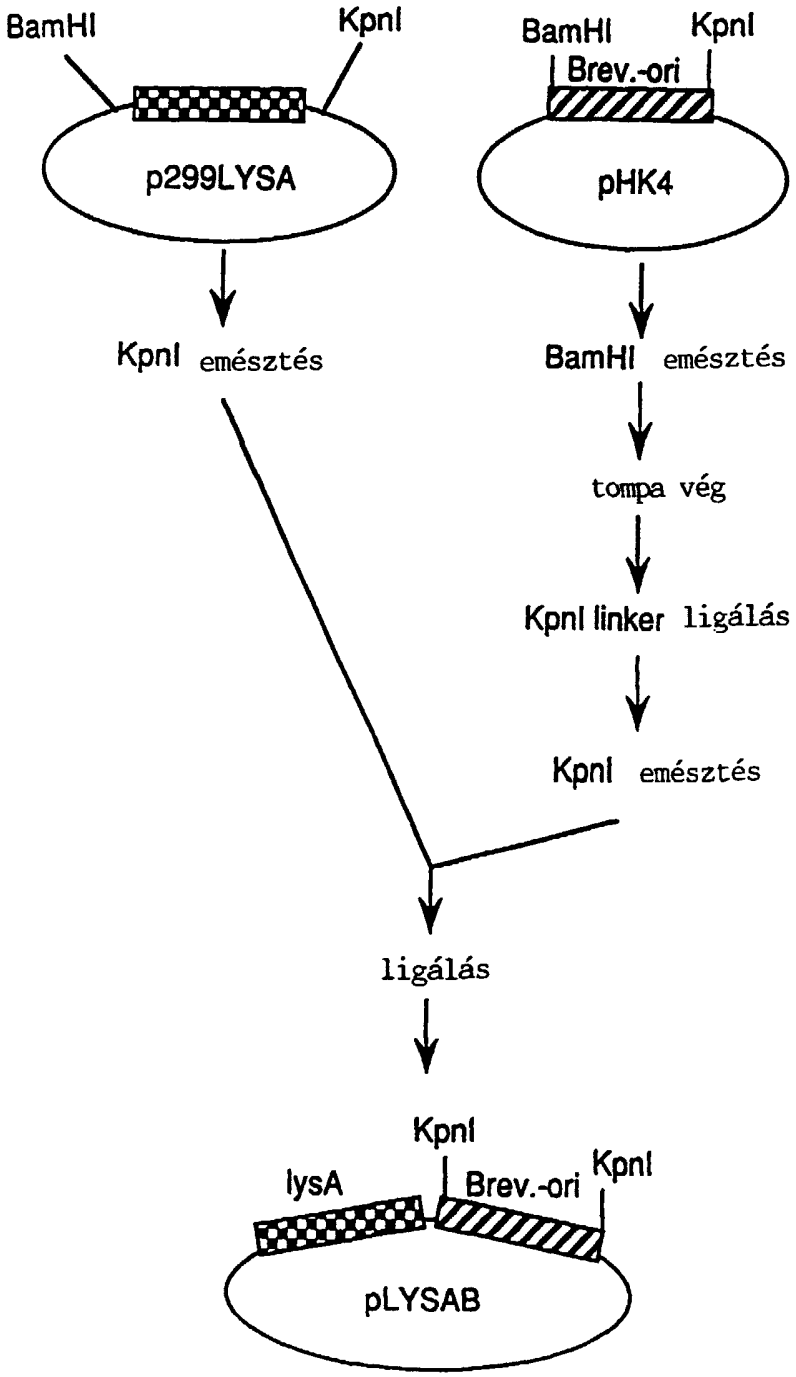
6. Eljárás L-lizin termelésére, *azzal jellemezve,* hogy 4. igénypont szerinti korineform baktériumot L-lizin termelését és felhalmozását biztosító közegben tenyésztünk, és az L-lizint a tenyészetből begyűjtjük.

7. Eljárás L-lizin termelésére, *azzal jellemezve,* hogy 5. igénypont szerinti korineform baktériumot L-lizin termelését és felhalmozását biztosító közegben tenyésztünk, és az L-lizint a tenyészetből begyűjtjük.

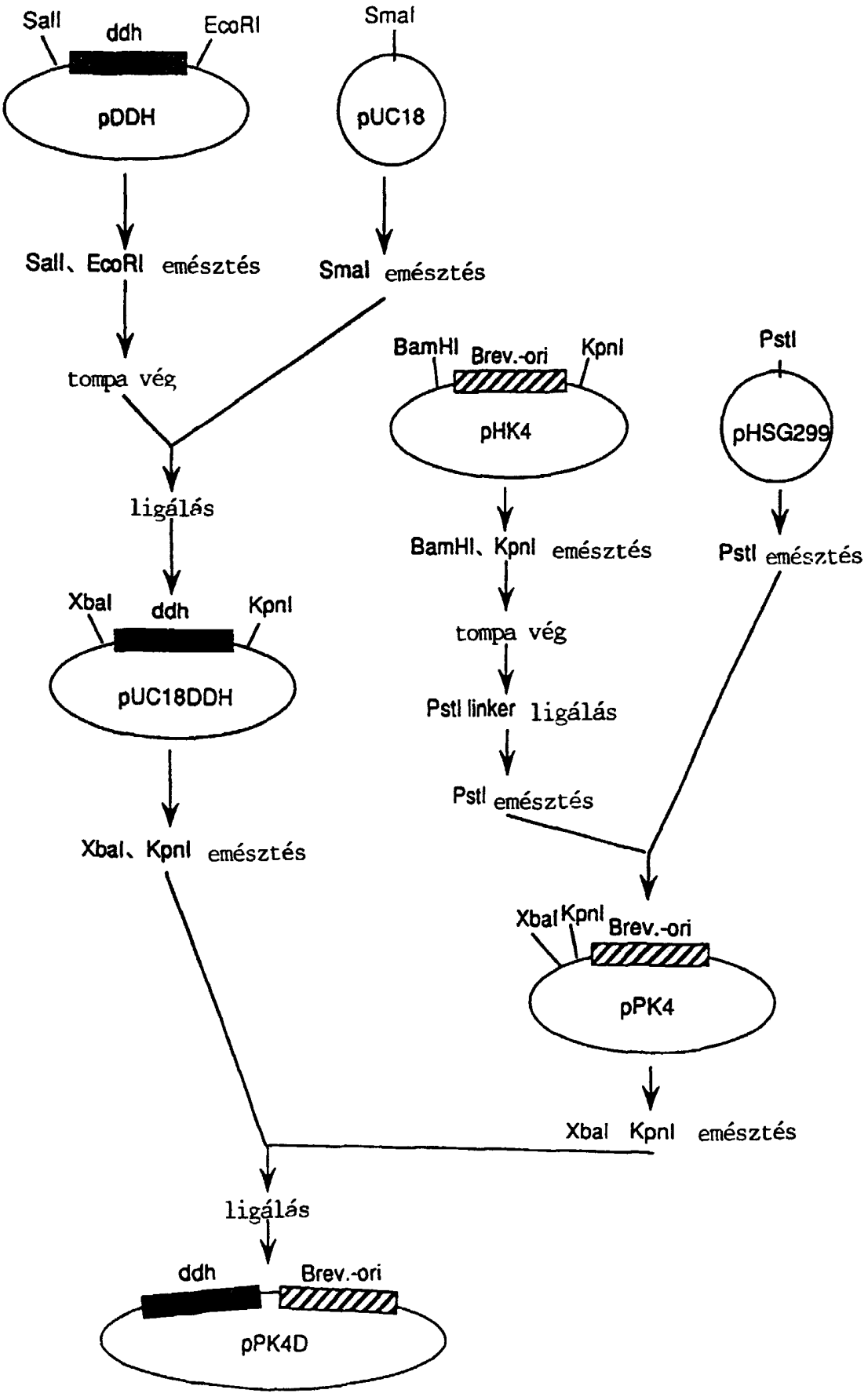
1. ábra


SmaI
pHSG399
lysA
PCR
SmaI emésztés
BamHI
KpnI
p399LYSA
BamHI
KpnI
pHSG299
KpnI, BamHI emésztés
KpnI, BamHI emésztés
BamHI
KpnI
p299LYSA

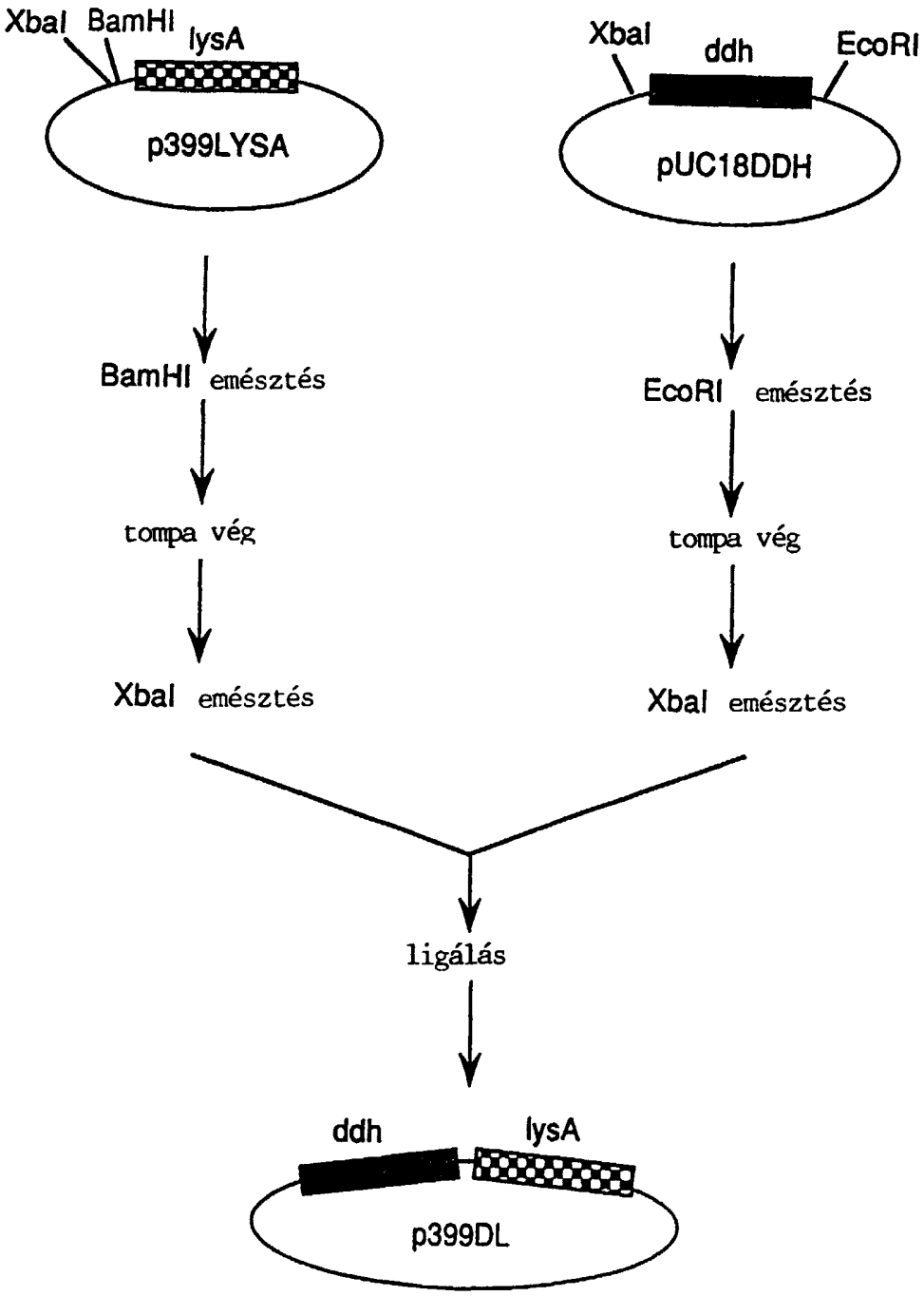
2. ábra


BamHI
KpnI
p299LYSA
BamHI
KpnI
Brev.-ori
pHK4
KpnI emésztés
BamHI emésztés
tompa vég
KpnI linker ligálás
KpnI emésztés
ligálás
KpnI
lysA
Brev.-ori
KpnI
pLYSAB

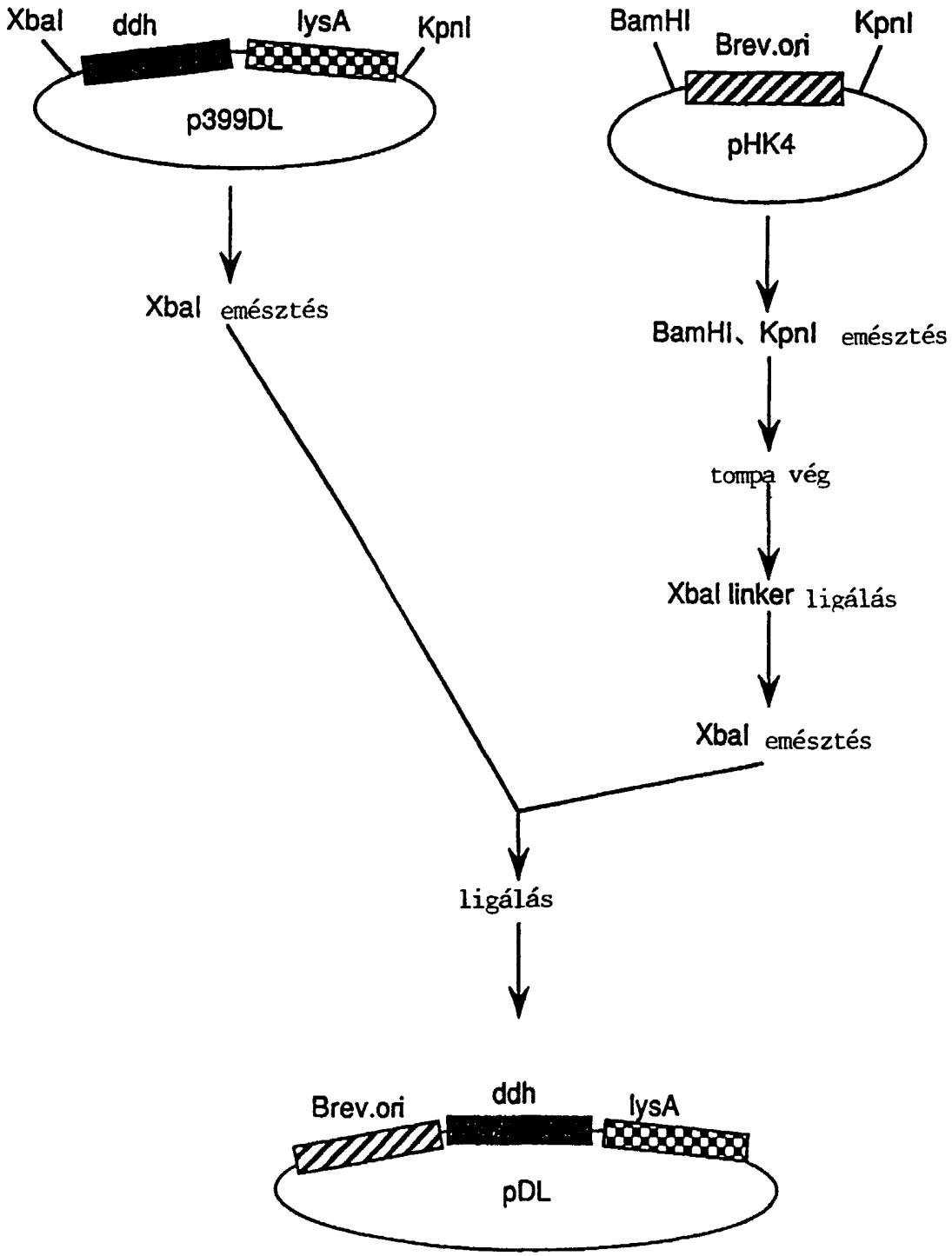
3. ábra


SalI
ddh
EcoRI
pDDH
SmaI
pUC18
SalI、EcoRI emésztés
SmaI emésztés
tompa vég
ligálás
BamHI
Brev.-ori
KpnI
pHK4
PstI
pHSG299
BamHI、KpnI emésztés
PstI emésztés
tompa vég
PstI linker ligálás
PstI emésztés
XbaI
ddh
KpnI
pUC18DDH
XbaI、KpnI emésztés
XbaI KpnI Brev.-ori
pPK4
XbaI KpnI emésztés
ligálás
ddh
Brev.-ori
pPK4D

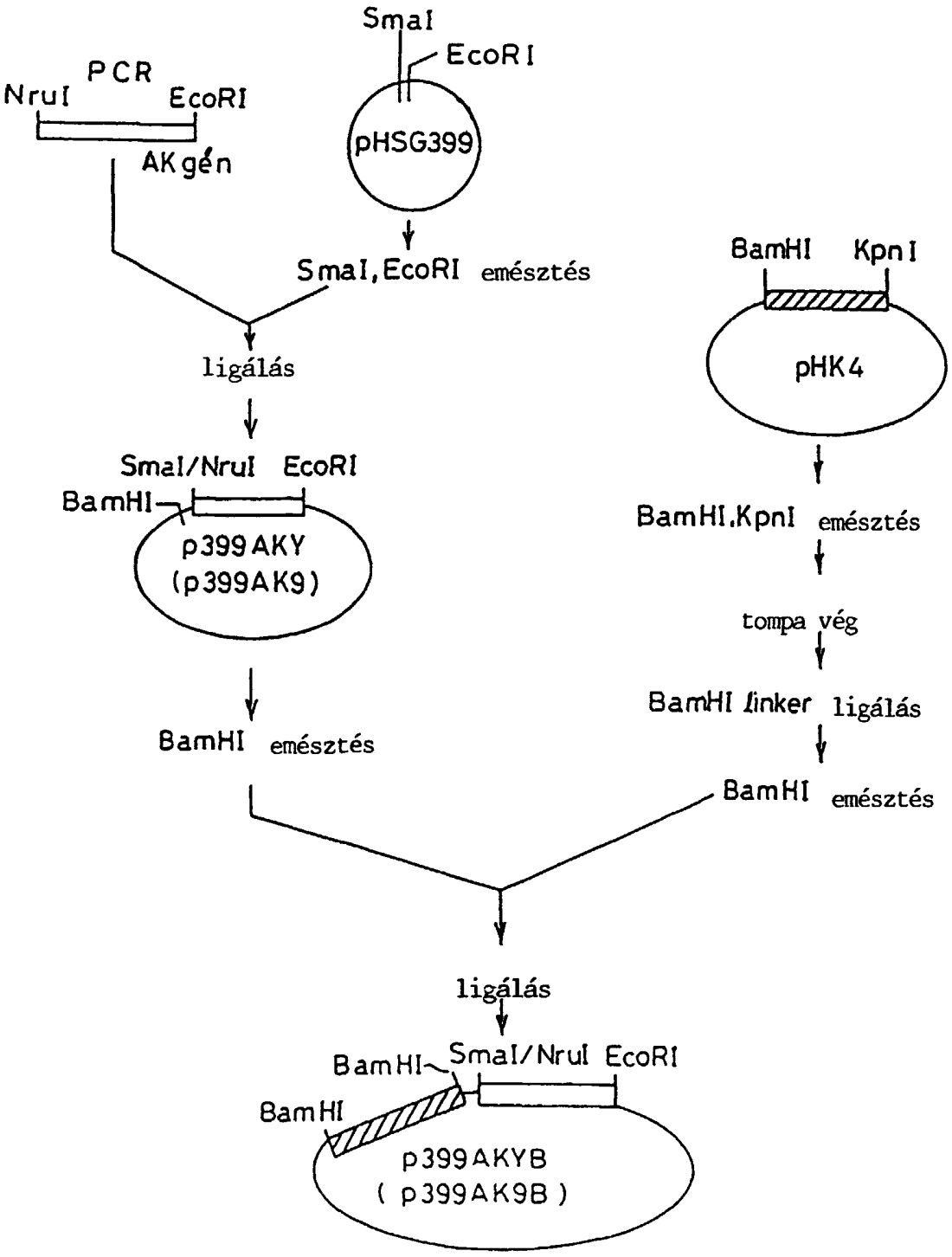
4. ábra


XbaI
BamHI
lysA
p399LYSA
XbaI
ddh
EcoRI
pUC18DDH
BamHI emésztés
EcoRI emésztés
tompa vég
tompa vég
XbaI emésztés
XbaI emésztés
ligálás
ddh
lysA
p399DL

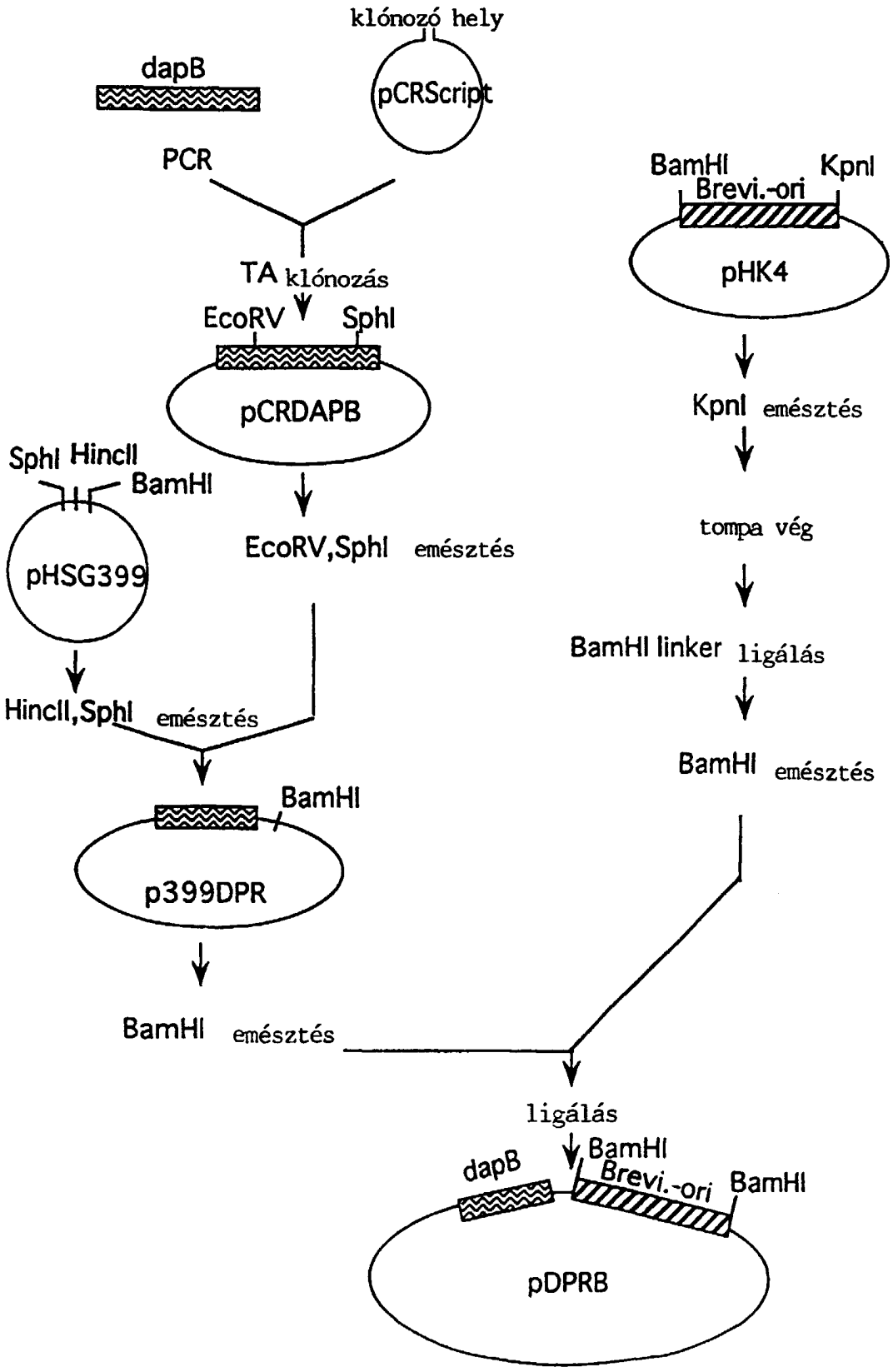
5. ábra


XbaI
ddh
lysA
KpnI
p399DL
BamHI
Brev.ori
KpnI
pHK4
XbaI emésztés
BamHI、KpnI emésztés
tompa vég
XbaI linker ligálás
XbaI emésztés
ligálás
Brev.ori
ddh
lysA
pDL

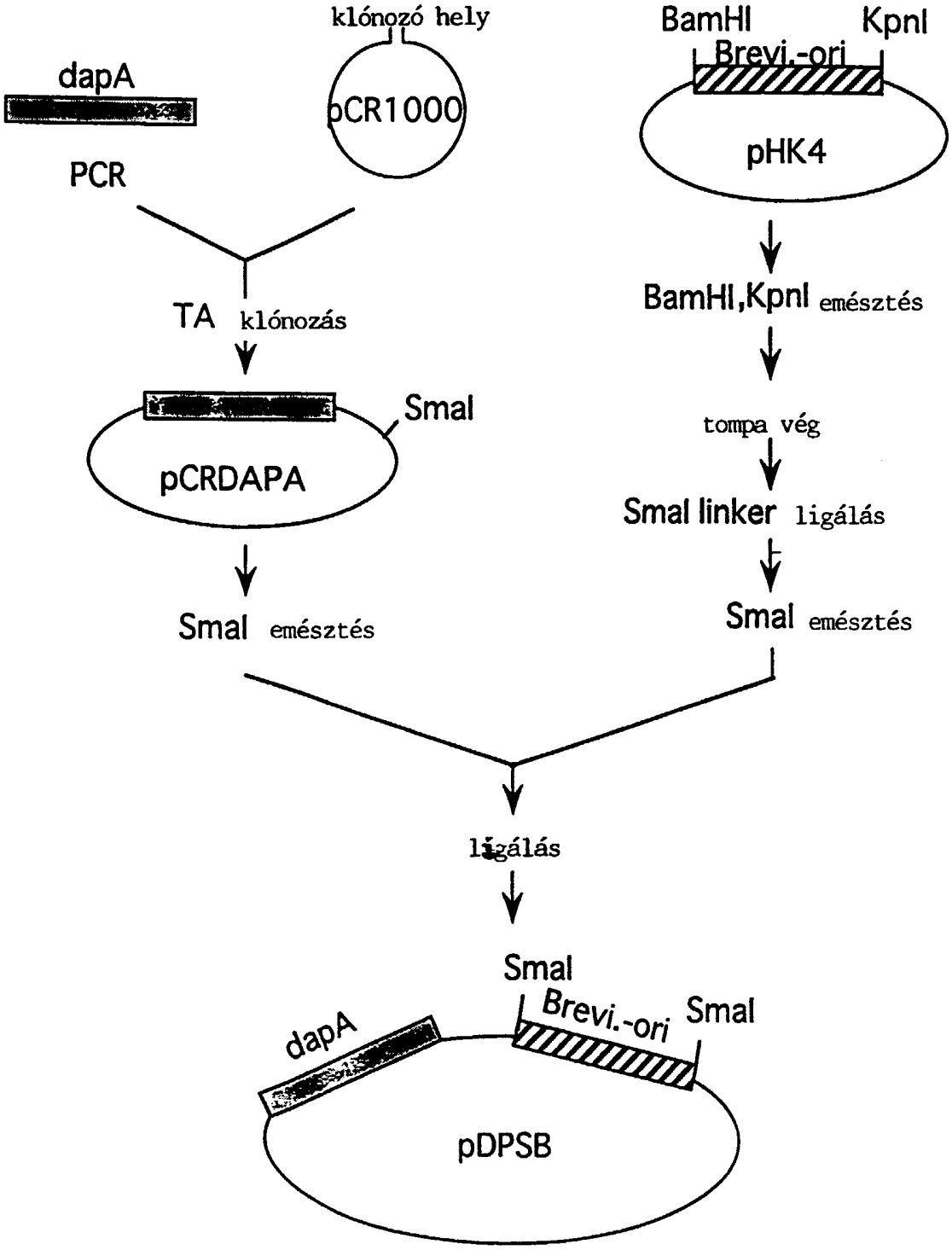
6. ábra


SmaI
EcoRI
PCR
NruI
EcoRI
AKgén
pHSG399
SmaI,EcoRI emésztés
BamHI KpnI
pHK4
ligálás
SmaI/NruI EcoRI
BamHI
p399AKY
(p399AK9)
BamHI.KpnI emésztés
tompa vég
BamHI linker ligálás
BamHI emésztés
BamHI emésztés
ligálás
BamHI
SmaI/NruI EcoRI
BamHI
p399AKYB
(p399AK9B)

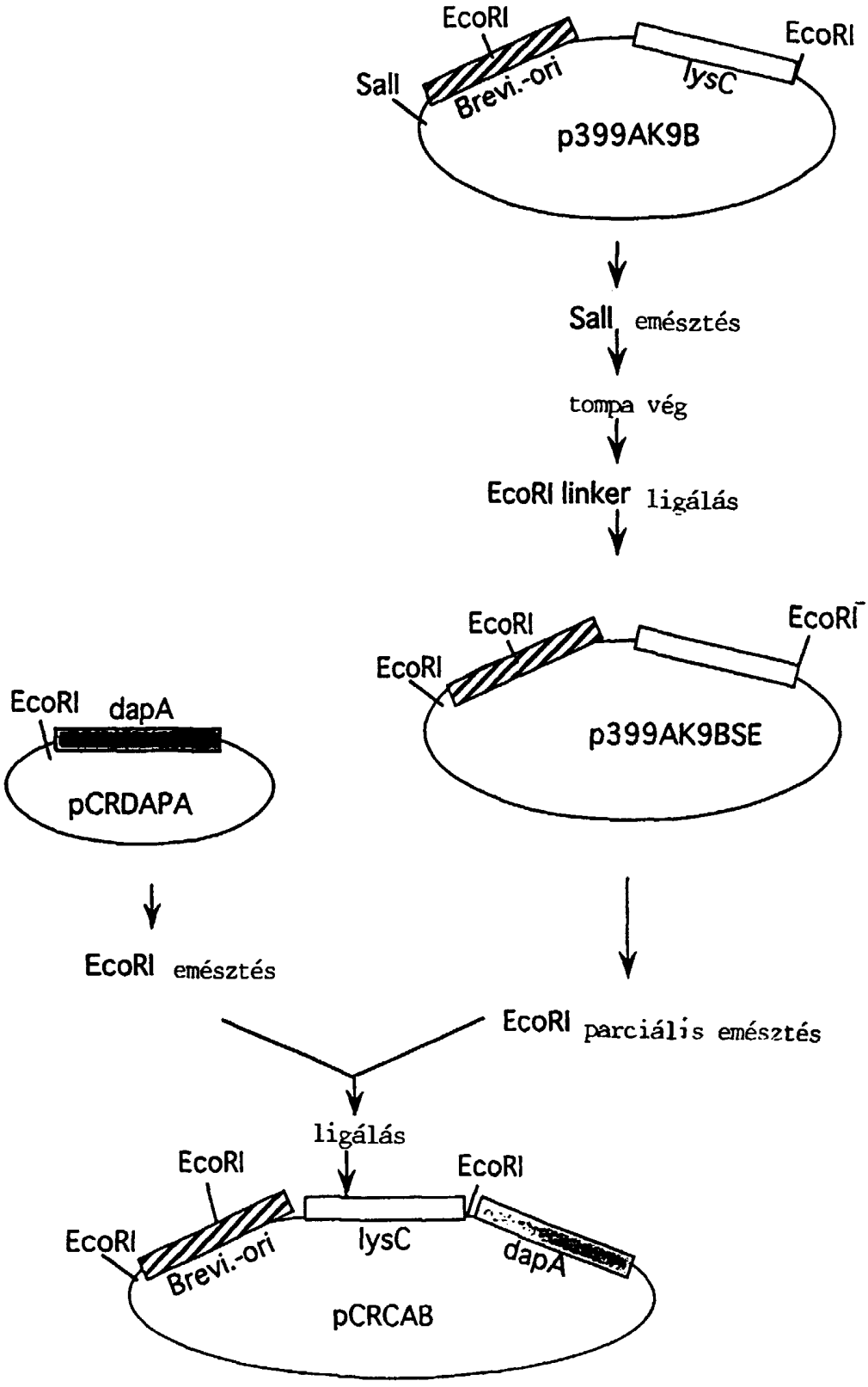
7. ábra


klónozó hely
dapB
pCRScript
PCR
TA klónozás
EcoRV
SphI
pCRDAPB
SphI HincII
BamHI
pHSG399
EcoRV,SphI emésztés
HincII,SphI emésztés
BamHI
p399DPR
BamHI emésztés
BamHI
Kpnl
Brevi.-ori
pHK4
Kpnl emésztés
tompa vég
BamHI linker ligálás
BamHI emésztés
ligálás
BamHI
dapB
Brevi.-ori
BamHI
pDPRB

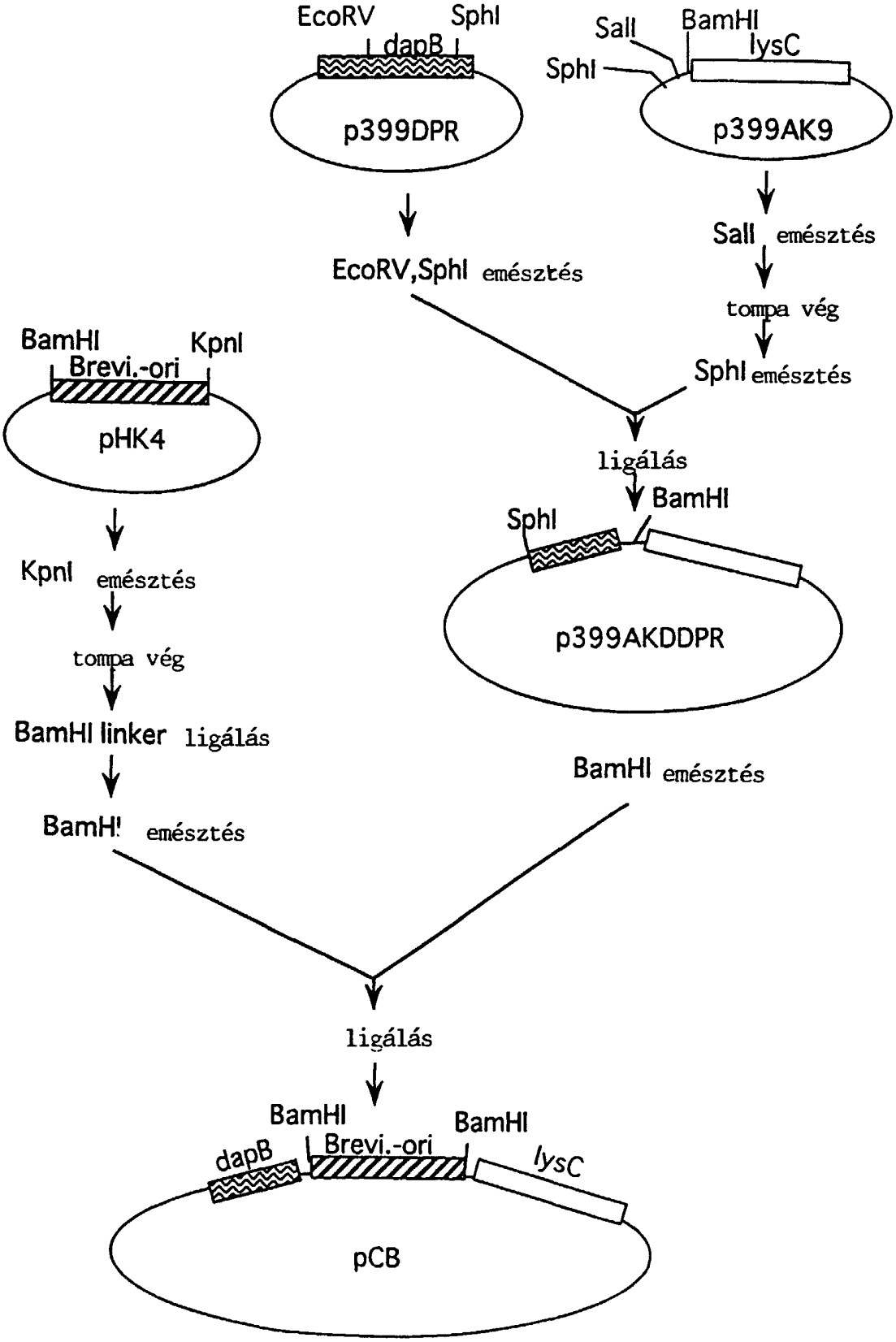
8. ábra


klónozó hely
dapA
pCR1000
PCR
TA klónozás
SmaI
pCRDAPA
SmaI emésztés
BamHI
KpnI
Brevi.-ori
pHK4
BamHI,KpnI emésztés
tompa vég
SmaI linker ligálás
SmaI emésztés
ligálás
SmaI
Brevi.-ori
SmaI
dapA
pDPSB

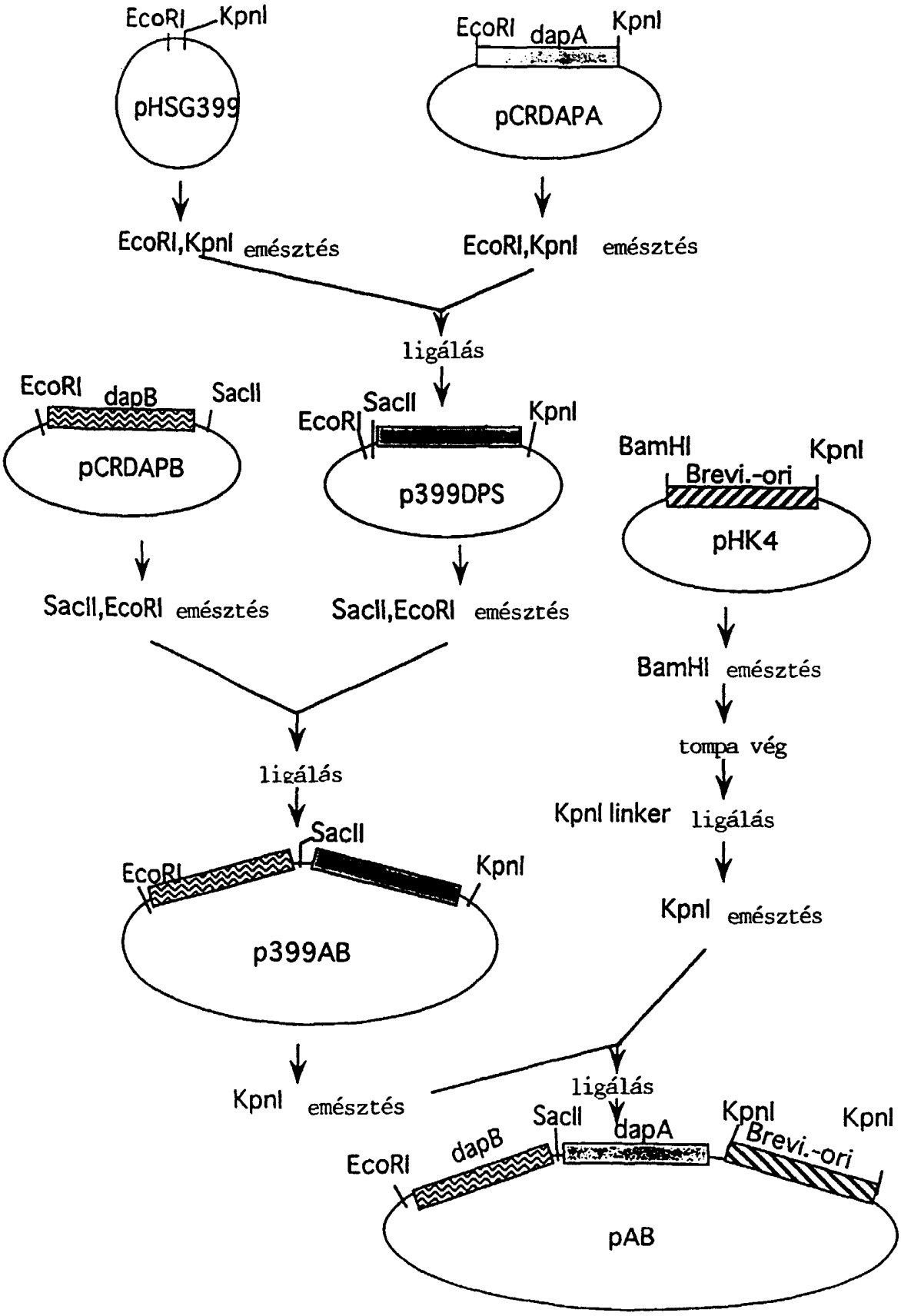
9. ábra


EcoRI
EcoRI
SalI
Brevi.-ori
lysC
p399AK9B
SalI emésztés
tompa vég
EcoRI linker ligálás
EcoRI
EcoRI
EcoRI
p399AK9BSE
EcoRI dapA
pCRDAPA
EcoRI emésztés
EcoRI parciális emésztés
ligálás
EcoRI
EcoRI
EcoRI
Brevi.-ori
lysC
dapA
pCRCAB

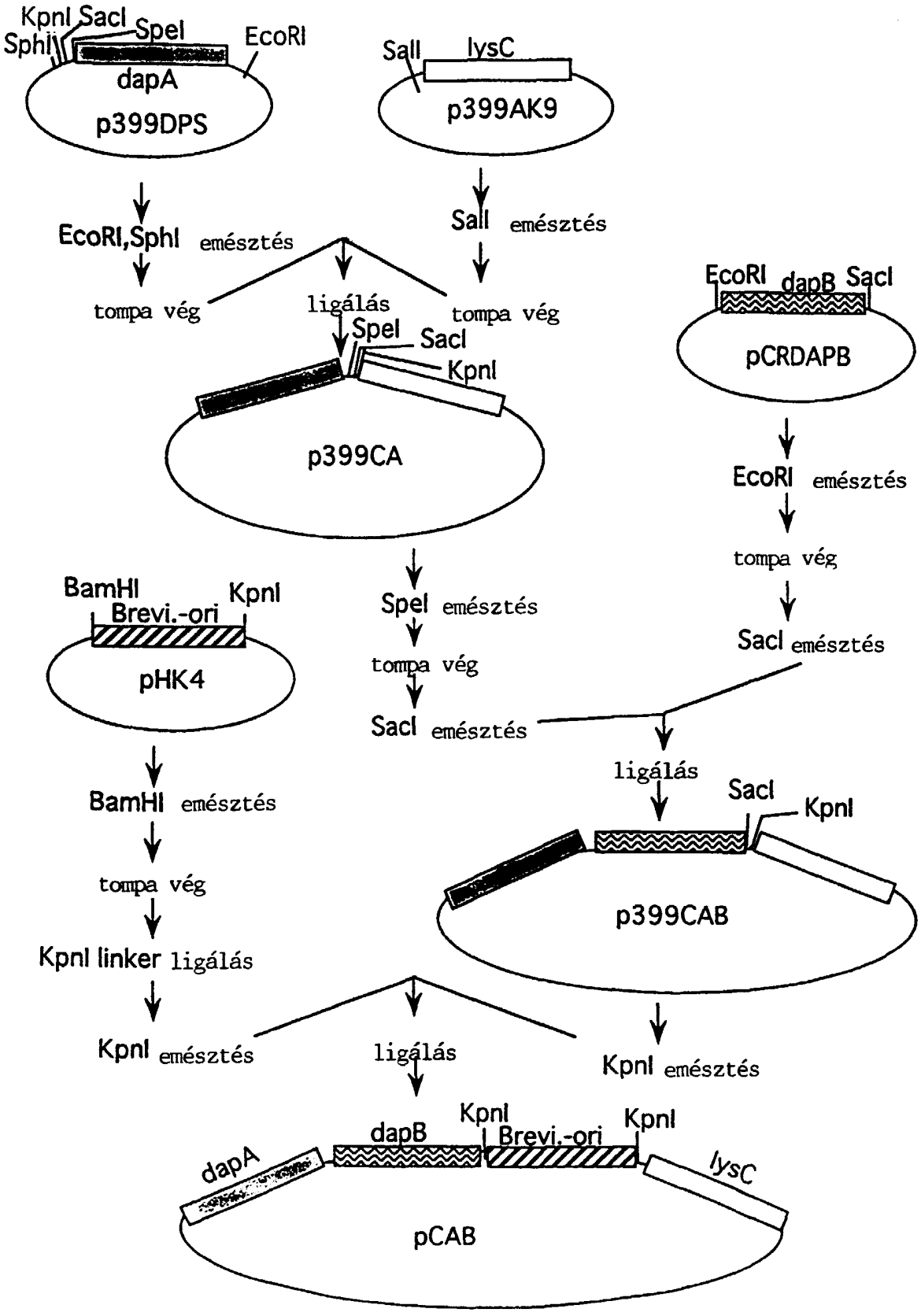
10. ábra


EcoRV
SphI
dapB
p399DPR
SalI
BamHI
lysC
SphI
p399AK9
SalI emésztés
tompa vég
EcoRV,SphI emésztés
SphI emésztés
BamHI
KpnI
Brevi.-ori
pHK4
ligálás
BamHI
SphI
p399AKDDPR
KpnI emésztés
tompa vég
BamHI linker ligálás
BamHI emésztés
BamHI emésztés
ligálás
BamHI
BamHI
dapB
Brevi.-ori
lysC
pCB

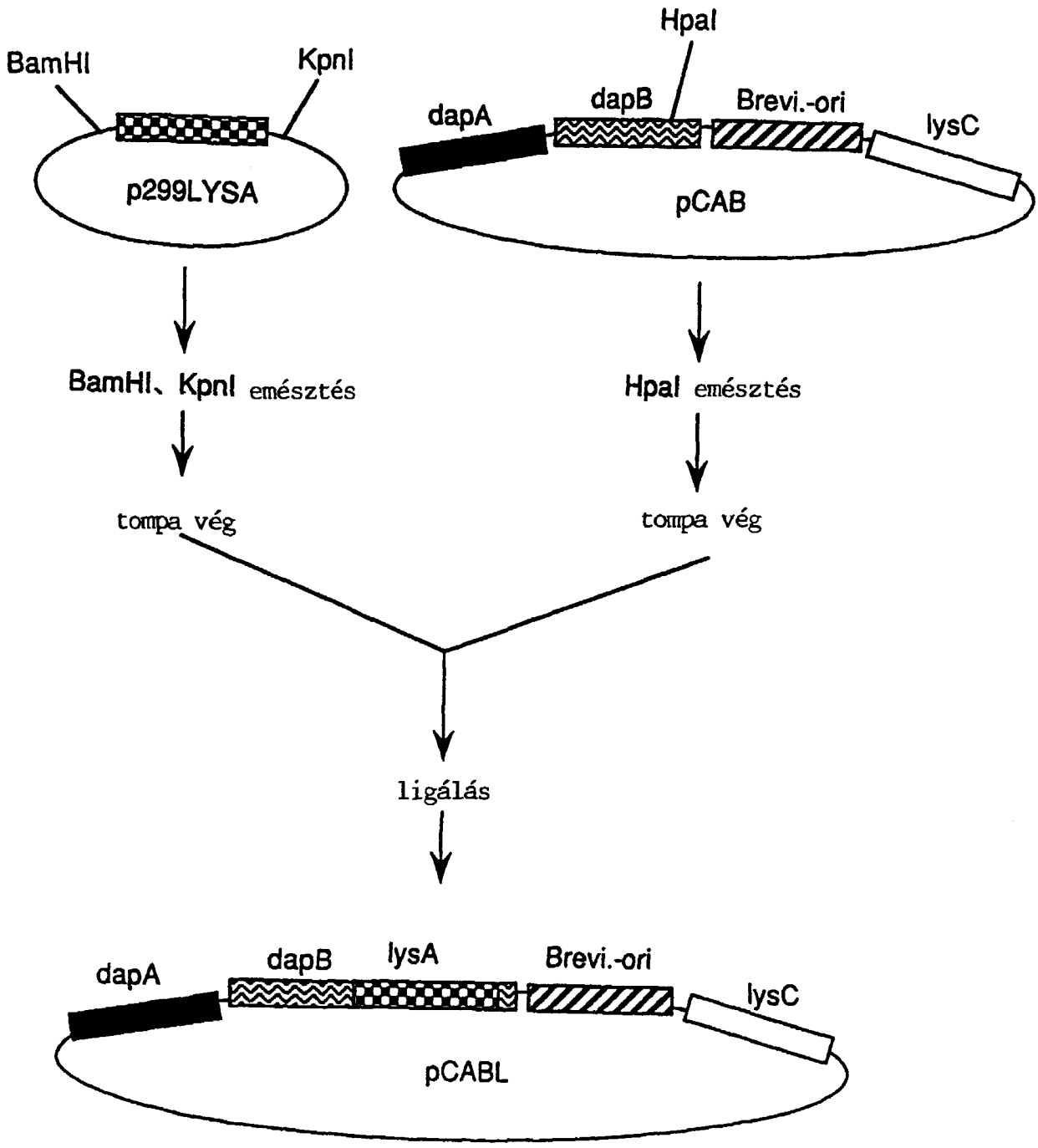
11. ábra


EcoRI
KpnI
pHSG399
EcoRI
dapA
KpnI
pCRDAPA
EcoRI,KpnI emésztés
EcoRI,KpnI emésztés
ligálás
EcoRI
dapB
SacII
pCRDAPB
SacII
EcoRI
KpnI
p399DPS
BamHI
KpnI
Brevi.-ori
pHK4
SacII,EcoRI emésztés
SacII,EcoRI emésztés
BamHI emésztés
tompa vég
ligálás
KpnI linker ligálás
SacII
EcoRI
KpnI
p399AB
KpnI emésztés
KpnI emésztés
ligálás
SacII
dapA
KpnI
KpnI
EcoRI
dapB
Brevi.-ori
pAB

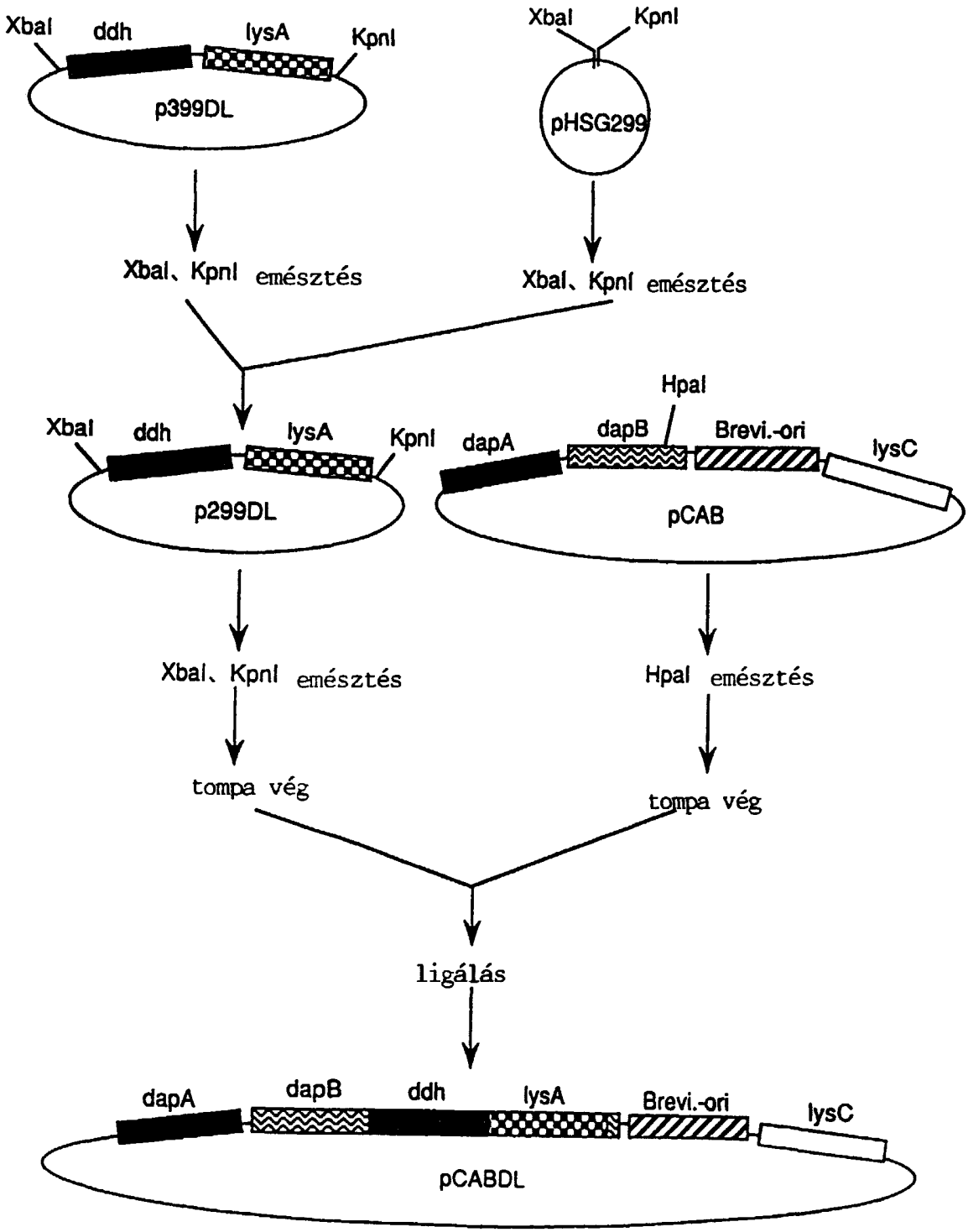
12. ábra


KpnI SacI
SphI
SpeI
EcoRI
dapA
p399DPS
SalI
lysC
p399AK9
EcoRI,SphI emésztés
tompa vég
SalI emésztés
ligálás
tompa vég
SpeI
SacI
KpnI
p399CA
EcoRI dapB SacI
pCRDAPB
EcoRI emésztés
tompa vég
SacI emésztés
BamHI
KpnI
Brevi.-ori
pHK4
SpeI emésztés
tompa vég
SacI emésztés
ligálás
SacI
KpnI
p399CAB
BamHI emésztés
tompa vég
KpnI linker ligálás
KpnI emésztés
ligálás
KpnI emésztés
KpnI
KpnI
dapB
Brevi.-ori
dapA
lysC
pCAB

13. ábra


BamHI
KpnI
p299LYSA
HpaI
dapA
dapB
Brevi.-ori
lysC
pCAB
BamHI, KpnI emésztés
HpaI emésztés
tompa vég
tompa vég
ligálás
dapA
dapB
lysA
Brevi.-ori
lysC
pCABL

14. ábra


XbaI
ddh
lysA
KpnI
p399DL
XbaI
KpnI
pHSG299
XbaI、KpnI emésztés
XbaI、KpnI emésztés
XbaI
ddh
lysA
KpnI
p299DL
HpaI
dapA
dapB
Brevi.-ori
lysC
pCAB
XbaI、KpnI emésztés
HpaI emésztés
tompa vég
tompa vég
ligálás
dapA
dapB
ddh
lysA
Brevi.-ori
lysC
pCABDL